

201427009B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

政策研究事業

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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

(H24-医薬-一般-009)

研究代表者 花尻(木倉) 瑠理

平成27年3月

平成24年度～26年度 総合研究報告書

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

目 次

I. 総合研究報告	
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	
花尻(木倉)瑠理 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 29
III. 研究成果の刊行物・別刷り 33

違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究

研究代表者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究要旨 指定薬物制度に対応し、具体的な化合物や植物を指定薬物として指定する際に考えられる問題点を科学的に解決し、規制化に必要な評価手法及び科学的データを監視指導・麻薬行政に提供することを目的として、危険ドラッグについて以下の研究を行った。

平成 24 年度から 26 年度に、危険ドラッグ製品 1108 製品を入手し、141 種類の新規流通危険ドラッグ成分(合成カンナビノイド及びその関連化合物 60, フェチルアミン系化合物 18, カチノン系 35, チオフェン系化合物 5, その他化合物 23)を同定した。平成 26 年に指定薬物に指定された 3,4-ジクロロメチルフェニデートのトレオ体とエリスロ体の鑑定分析用標品を合成した。合成カンナビノイド(平成 25 年 3 月施行)及びカチノン系化合物(平成 26 年 1 月施行)に対する包括規制前後の危険ドラッグ流通変化を検討するために、平成 21 年後半から 24 年度に入手した危険ドラッグ 1197 製品及び主に平成 25 年度に入手した 887 製品を対象に含有成分を調査した。合成カンナビノイドにおいては、包括規制範囲のパブリックコメント募集後、包括範囲内の新規化合物は市場に登場しておらず、常に流通の主流であったナフトイルインドール骨格を有する新たな化合物の出現はほぼ沈静化した。しかし、従来流通していた化合物とは異なる構造を有する合成カンナビノイドの出現が顕著であり、また、同一製品中から、作用の異なる複数の化合物が検出される事例が増加した。主に平成 25 年度に入手した製品分析の結果において、調査対象期間内に合成カンナビノイド 51, カチノン系化合物 32, その他 25, 合計 108 種類の危険ドラッグ成分が検出された。当該年度で最も検出数が多かったのは、合成カンナビノイド MAM-2201 及び 5F-QUPIC で、カチノン系化合物ではピロリジニル構造を有する α -PVP, α -PBP, その他化合物ではチオフェン誘導体の α -PVT であり、また 25I-NBOMe や 2C-C-NBOMe など幻覚作用を有するフェネチルアミン系化合物も多く検出された。カチノン系化合物に関しては、指定薬物や麻薬としての規制後も、市場から完全には消失せず、一部が残留して流通する傾向が見られた。また、合成カンナビノイドと同様、包括規制後、直ちに新たな包括範囲外化合物の出現が認められた。合成カンナビノイド及びカチノン系化合物の包括規制範囲内の代表的な化合物について GC-MS 及び LC-PDA-MS の測定データを検討し、規制範囲化合物である可能性を判断するためのスクリーニング手法を提示した。また、位置異性体を複数有するカチノン系 61 化合物についても機器分析データを取りまとめ、各異性体の識別法を検討した。平成 24 年度から 26 年度までに指定薬物に指定された計 168 化合物について分析データを検討し、GC-MS もしくは LC-MS 分析を用いた確認分析において注意が必要な化合物群をまとめた。超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法による合成カンナビノイド類及び実試料の分析法を検討した。危険ドラッグの簡易識別法を検討することを目的とし、指定薬物等、合計 152 化合物を対象として、TLC 分析及び呈色試薬による識別法を検討した。さらに、構造異性体である指定薬物と未規制化合物について、卓上型 NMR を用いた簡易識別法を検討し、その有用性を論じた。生体試料中薬物分析にも着目し、ヒト肝ミクロソーム画分を用いて、フェネチルアミン系 17 種類、合成カンナビノイド 9 種類、トリプタミン系 8 種類の代謝実験を行い、得られた各代謝物について LC-TOF/MS 及び LC-MS/MS による分析データを蓄積した。

活性未知の危険ドラッグ成分について、中枢作用を有する蓋然性を科学的に評価することを目的として、*in silico* 評

価法により、11 種類の活性未知新規流通危険ドラッグ成分の活性予測を行った。また、長鎖アルキル基を有する包括範囲外カチン系化合物を含む計 35 化合物の活性値を組み入れた QSAR モデル式を構築した。11 種類の活性未知新規流通カチン系及びフェネチルアミン系化合物について、ラット脳より調製したシナプトソーム画分を用いて、モノアミン(ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニン)再取込に対する阻害作用を検討し、構造類似麻薬化合物と同等の活性を有することを示した。また、JWH-018 と 53 種類の活性未知新規流通合成カンナビノイドに対して、カンナビノイド受容体(CB₁, CB₂)に対する親和性を測定し、ほとんどの化合物で大麻活性成分 Δ⁹-THC と同等以上の親和性を有することを示した。特に、平成 24 度に死亡事例や多くの他害事故を引き起こした MAM-2201、平成 24 年終わりから平成 25 年度前半にかけて危険ドラッグ製品から最も検出され、複数の死亡事例や交通事故を引き起こした 5F-QUPIC、平成 26 年前半に最も検出された FUB-PB-22、平成 26 年度に国内外で事故や死亡事例を含む健康被害が報告された 5F-ADB-PINACA、5F-AMB、AB-CHMINACA、5F-ADB、MDMB-CHMICA 等において極めて強い親和性が認められた。In vivo 評価手法として、まず、JWH-018 を含む 44 種類の新規流通合成カンナビノイドについてマウスに及ぼす作用を調べた結果、34 化合物において薬物投与マウスの自発運動量が有意に減少した。特に、MDMB-CHMINACA は投与後 4 匹中 2 匹が死亡した。また、アミドエステル類は、陽性対照である JWH-018 以上に強力または同程度の行動量抑制作用を示したが、この結果は、受容体親和性評価結果に矛盾しないものであった。さらに、一部の化合物で投与後に痙攣、歩行失調、挙尾反応、四肢の硬直及び無動状態などが観察され、これら薬物による健康被害が懸念された。一方、QUPIC、5F-QUPIC、NNEI indazole analog 及び JWH-018 をラットの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。その結果、いずれもラットの自発運動量を有意に減少させ、ラットの脳波に JWH-018 と類似したパターンの変化を与えた。また、5F-ADB 及び JWH-018 を、マウスの腹腔内に投与し、同様に脳波および自発運動量の変化について検討した結果、5F-ADB は投与後、マウスの自発運動量を有意に減少させ、4 匹中 1 匹が死亡した。その抑制作用は JWH-018 より強力であり、さらに長時間にわたり持続した。また、5F-ADB 及び JWH-018 はマウスの脳波パターンに変化を与えたが、両化合物の脳波スペクトルに明らかな共通パターンはみられず、それぞれ自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関はみられなかった。合成カンナビノイド 5F-ADB 及び JWH-018、大麻活性成分 Δ⁹-THC のマウス脳における神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* mRNA)発現への影響を検討した結果、共通して扁桃体中心核(CeA)の *c-fos* 発現の上昇を誘発した。また、Δ⁹-THC とは異なり、5F-ADB、JWH-018 の投与は室傍核(PVN)や視索上核(SO)における顕著な *c-fos* 発現の上昇も誘導した。従って、PVN や SO の *c-fos* 発現を指標にすることで、Δ⁹-THC と 5F-ADB および JWH-018 の作用を区別できると考えられた。さらに、全脳活動マッピングの結果から、5F-ADB および JWH-018 は Δ⁹-THC よりも大きな影響を脳活動に与えると推定された。なお、カンナビノイド受容体には、CB₁ 受容体と CB₂ 受容体の 2 種類が存在しており、中枢神経系においては、神経細胞には CB₁ 受容体が、ミクログリアには CB₂ 受容体が発現している。CB₂ 受容体選択的アゴニストである JHW-015 及び HU-308 はラット初代培養ミクログリアの ERK1, 2 のリン酸化を誘導し、このリン酸化は CB₂ 受容体選択的アンタゴニストである SR144528 で抑制された。ミクログリアを利用してウエスタンブロットング法を用いて、合成カンナビノイドの CB₂ 受容体への作用を検出できることがわかった。合成カンナビノイド MAM-2201 について、マウス小脳スライス標本をモデルとし、パッチクランプ法を用いて、小脳の平行線維-プルキンエ細胞間のグルタミン酸作動性興奮性神経伝達の指標である EPSC に対する合成カンナビノイドの抑制作用について検討した結果、MAM-2201 はヒトの小脳の運動機能ならびに運動学習機能に影響を及ぼす可能性が示され、その中枢神経作用は麻薬 JWH-018 よりも強いことが示唆された。また、MAM-2201 及びカチン系化合物 α-PVP を対象とし、各々を単独、または両化合物を混合したものを、それぞれラットの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。その結果、両化合物を混合投与した場合、先に α-PVP の作用が発現し、その後遅れて MAM-2201 の作用が

発現すると考えられた。さらに、単独使用及び併用時における薬物の危険性評価を目的として、MDMA 及びメタンフェタミンを対象として、マイクロダイアリス法により、各投与時の脳内におけるドーパミン及びセロトニン、また脳内薬物の濃度をモニタリングした。併用投与群においては、脳内ドーパミン濃度が有意に上昇し、脳内薬物濃度及び滞留時間も単独投与群と比較して増加傾向を示した。このことから、これら薬物を併用すると健康被害が増悪する可能性が示唆された。また、マウスにエトカチノン及びペンチロンを投与し、マイクロダイアリス法により、脳透析液中のドーパミン及びセロトニン量の変化を検討した。その結果、エトカチノン及びペンチロンは側坐核においてドーパミン及びセロトニンを上昇させ、依存性を有する可能性が示唆された。

植物系危険ドラッグについては、危険ドラッグ市場に流通する乾燥植物細片混合物 69 製品について、DNA の塩基配列から植物種の同定を行い、製品毎に使用される植物の分類を行った。その結果、幻覚性植物と疑われる DNA 塩基配列は検出されず、植物片の多くは欧州や日本などでもハーブティーなどに利用される植物種(平成 24 年度:マシュマロウ、カモミールなど、平成 25 年度:ウスベニタチアオイなど)であった。また、微量・少量の混入植物種の判定は困難であるが、化学分析に用いた製品のメタノール抽出残渣試料を用いても遺伝子分析による植物種の同定は可能であることを示した。さらに、向精神活性を有する植物成分、メスカリン、DMT、LSA が各々検出された植物製品の基原種を同定した。一方、*Salvia divinorum* の簡易識別法を開発することを目的とし、LAMP 法により、目視での判定が可能な Hydroxynaphthol Blue (HNB)を用いた比色検出法を用いて検討を行い、その有用性を検証した。

以上、本研究結果は、厚生労働省の監視指導行政に直接貢献する研究であり、国の違法ドラッグ対策に即したものと考えられる。

研究代表者	豊岡 利正 静岡県立大学薬学部 教授
花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長	和田 光弘 長崎大学大学院医歯薬学総合 研究科 准教授(平成 24, 25 年度)
研究分担者 (アイウエオ順)	研究協力者 (アイウエオ順)
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	入江 智彦 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 主任研究官
裏出 良博 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究 機構 分子睡眠生物学研究室 教授	河村 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官(平成 26 年度)	小早川 令子 大阪バイオサイエンス研究所 神経機能学部門・研究室長
栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部室長	佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長(平成 24, 25 年度)	出水 庸介 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 室長
関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長	最上 由香里 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

A. 目的

平成 24 年度以降、危険ドラッグが関与したと考えられる救急搬送事例(死亡事例を含む)や自動車事故等の他害事件の報告が増加している。厚生労働省は、流通と規制の「いたちごっこ」的状況を打破すべく、平成 24 年度及び 25 年度に 2 種類の構造を対象として「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(医薬品医療機器等法、平成 26 年 11 月 25 日より薬事法が改称)下で初めて包括指定を導入した。また、麻薬取締官及び麻薬取締員に医薬品医療機器等法上の指定薬物に対する取締権限の付与等を内容とする法改正(平成 25 年 10 月 1 日)を、指定薬物の単純所持・使用等を罰則付きで禁止すること等を内容とする法改正(平成 26 年 4 月 1 日に施行)を実施した。さらに、平成 26 年 7 月には、6 月末に起きた池袋の自動車暴走事件に関係したとみられる 2 物質について、指定薬物制度が誕生して初めて「指定手続きの特例」として定められている緊急指定を行った。その後も 12 月末までに数回にわたり、「公益上、緊急に命令等を定める必要がある」場合に該当するとして、意見募集手続きを行わずに指定薬物指定の省令を公布し、また通例では 30 日となっていた周知期間も 10 日に短縮したスピード施行を行った。その結果、平成 27 年 2 月 28 日時点で指定薬物総数は 1454 物質となった。一方、平成 26 年 8 月末より断続的に、医薬品医療機器等法に基づき、指定薬物の販売の可能性がある店舗に対し検査命令を実施し、検査結果が出るまで該当商品の販売を禁止する措置をとっている。さらに、危険ドラッグに係わる医薬品医療機器等法が改正され(12 月 17 日施行)、「指定薬物、指定薬物である疑いがある物品」だけでなく、「指定薬物と同等以上に精神毒性を有する蓋然性が高い物である疑いがある物品」についても検査命令及び販売等停止命令を行うことが可能となり、さらに、これら物品について、広域禁止物品として告示し、生産及び流通を広域的に規制する措置をとることが可能となった。これを受け、法改正施行直後に、危険ドラッグ販売店に対する立入検

査が実施され、平成 26 年 12 月 26 日、「生産及び流通を広域的に規制する必要がある」25 物品が初めて告示され、広域規制製品としてそれらの写真が厚生労働省のホームページ上で公開された。このような背景のもと、本研究は、指定薬物制度に対応し、どのような化合物(植物)を、どのような根拠で規制化するか検討するための実効的な資料を、監視指導・麻薬行政に提供するために行うものである。

近年、医薬品開発途上で大量に誕生した特定の受容体に対し高い活性を有する化合物が、違法ドラッグ市場に次から次へと新たに登場して大きな問題となっている。これら化合物の迅速な規制化を可能とするために、まずは全国的な流通実態調査を行い、速やかに問題となる新規流通化合物を同定する。そして、規制後に各鑑定機関において必須とされる分析用標品及び各種分析データの整備を行うと共に、これら薬物の迅速分析法の開発を行う。また、インターネット等で販売される違法ドラッグ製品調査や諸外国の薬物統轄機関との定期的な情報交換を通じて新規薬物流通情報を収集し、新しく市場に登場した化合物について、規制根拠となる各種科学的データを検討するとともに、国立衛研で構築した違法ドラッグデータベースを通じて、公的分析機関に対し迅速に情報公開を行う。さらに、近年急増している救急搬送時における対応、さらには改正薬事法による指定薬物所持使用の規制を鑑み、*in vitro* による違法ドラッグの体内動態の検討・生体試料中薬物分析も行う。一方、指定薬物指定には中枢作用を有する蓋然性が高いことが必要とされているが、そのための的確なスクリーニング法は少ない。そこで、新規違法ドラッグ成分について、① QSAR(定量的活性相関)を中心としたコンピューターモデリングを用いた活性予測、②合成カンナビノイドのカンナビノイド受容体との結合親和性測定による網羅的活性評価、③カチノン系及びフェネチルアミン系化合物のラット脳より調製したシナプトソーム画分におけるモノアミン再取込に対する阻害作用

評価, ④薬物投与動物の行動変化, 脳波変化及び脳内アミン量変化による薬理学的効果の判定, ⑤マウス脳におけるシナプス伝達の反応性を指標とした薬効評価, ⑥マウス全脳を用いた *c-fos* マッピングによる合成カンナビノイド投与マウスにおける一定期間の脳活動の総和を可視化する手法, ⑦中枢神経系免疫担当細胞ミクログリアの CB₂ 受容体刺激によって引き起こされる ERK1/2 リン酸化を指標とする手法等を実施し, これら化合物の危害影響予測手法を検討する. 植物系違法ドラッグについては, 市場に流通する植物製品の遺伝子解析による基原種の特定手法の開発及び成分分析を行う.

B. 研究方法

1. 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(花尻)

1) 指定薬物包括規制前後における違法ドラッグの流通変化について

国立衛研においてインターネットを通じて平成 21 年 9 月～平成 25 年 3 月までに入手した 1197 製品(乾燥植物細片, 粉末, 液体, シート状等)を対象として, 平成 25 年 3 月施行の合成カンナビノイド包括規制に対応し, 包括規制前の合成カンナビノイド流通傾向, また包括規制前後に検出された合成カンナビノイドの傾向について調査した. さらに, 平成 24 年 2 月～平成 26 年 3 月までに入手した 887 製品を対象として, 平成 26 年 1 月施行のカチノン系化合物包括規制にも対応し, 規制前後でどのような薬物流通変化が認められたのか, 指定薬物規制後も流通が認められた薬物はどのようなものがあるのか, 最も流通している化合物群は何か, 今後どのような化合物が出現する可能性があるのか等, 検討を行った.

2) 指定薬物(包括規制含む), 異性体, 構造類似関連化合物の TLC, GC-MS 及び LC-PDA-MS による識別法について

簡易スクリーニング法検討のために, 合成カンナビノイド類 55 種類, カチノン系 36 化合物, フェネチルア

ミン系化合物 34 種類, トリプタミン系化合物 14 種類, その他 13 種類, 合計 152 化合物を対象とし, 2 種の展開溶媒を用いて TLC 分析を行い, 各 Rf 値を確認した. また 4 種類の検出試薬(呈色試薬)による発色を確認し, 色調の差異を検討した.

合成カンナビノイド包括規制範囲化合物について GC-EI-MS 及び LC-ESI-MS による識別法を検討した. 位置異性体を複数有するカチノン系化合物 61 化合物について, HP-1MS タイプのキャピラリーカラムを用いた GC-MS 及び ODS カラムを用いたグラジエント条件による LC-PDA-MS における保持時間, UV スペクトル, EI マススペクトル, ESI マススペクトルデータを取りまとめ, 各異性体の識別法について検討を行った. また, カチノン類包括規制範囲化合物 66 化合物について, GC-MS (EI) 及び LC-PDA による分析法を検討した. GC-MS (EI) においては, 1 級アミン及び 2 級アミンであるカチノン類 41 物質のトリフルオロアセチル (TFA) 誘導体のデータも取得した.

平成 24 年度から平成 26 年度(2 月)までに指定薬物に指定された計 168 化合物(麻薬に指定された物質を含む, 包括指定化合物数を除く)に焦点をあて, GC-MS もしくは LC-MS 分析において, 分解が認められる, 異性体との識別が困難である等, 注意が必要な化合物群の分析データをまとめた.

3) 新規流通違法ドラッグの受容体親和性評価について

JWH-018(麻薬)及び新規流通合成カンナビノイド 53 化合物について, カンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体に対する各化合物の dose-response curve を作成し, トレーサーとレセプターの結合を 50%阻害する濃度(IC₅₀ 値)を算出した. また, 上記計 54 種類のカンナビノイド受容体親和性について, 構造と IC₅₀ 値の関係について論じた.

さらに, 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 化合物とエトカチノン(麻薬)を対象とし, ラット脳(線条体, 視床下部及び橋延髄)

から調製したシナプトソーム画分を用いて、ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニンの3測定系において、モノアミン再取込に対する各化合物の阻害作用(IC₅₀値)について検討した。

2. 違法ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定(内山)

1) 平成 24-26 年度に入手した違法ドラッグ製品中の新規流通違法ドラッグ成分の同定

平成 24-26 年度に入手した違法ドラッグ 1108 製品(乾燥植物細片, 粉末, 液体, シート状等)について GC-MS, LC-MS 分析を行った。このうち, 未知の成分が検出された製品から, リサイクル分取 HPLC 及び分取 HPLC を用いて各化合物を単離し, 高分解能 MS 分析及び NMR 分析により同定を行った。また, 標準品があるものについては直接比較し, 同定した。

2) 卓上型 NMR を用いた ¹H-NMR スペクトルによる異性体識別法の検討

構造異性体である指定薬物と未規制化合物について, 卓上型 NMR (45 MHz, 60 MHz, 80 MHz) を用いた識別の有無を検討した。位置異性体として, ピペラジン系化合物 1-(3-methylbenzyl)piperadine (指定薬物), 及び未規制化合物 1-(2-methylbenzyl)piperadine, 1-(4-methylbenzyl)piperadine, また構造異性体関係にある指定薬物として, カチノン系化合物 4-Methyl-ethcathinone 及び 4-Methyl-buphedrone, トリプタミン系化合物 5-MeO-MIPT 及び 5-MeO-DET について検討を行った。

3) 大麻主活性成分 Δ^9 -THC 及び合成カンナビノイド 5F-ADB, JWH-018 の神経活動マーカー遺伝子 (*c-fos* m-RNA) 発現への影響

マウスの全脳を用いて, 危険ドラッグの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ために, 合成カンナビノイドとして, 新規流通成分 5F-ADB および麻薬成分である JWH-018 の *c-fos* 発現への影響を検討した。また, 大

麻の主活性カンナビノイド: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, 麻薬)の結果と比較した。

なお, 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。

3. 違法ドラッグの分析に関する研究(豊岡)

危険ドラッグにおいては, 構造が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。またこれら有害成分を特定できなければ, 指定薬物として取締りができないため, 迅速な検査・鑑定法の確立が求められている。そこで, 1) SFC-MS による合成カンナビノイド類の分析, 2) ヒト肝ミクロソーム画分を用いた違法ドラッグの代謝研究を実施した。

1) SFC-MS による合成カンナビノイド類の分析

合成カンナビノイド 1mg を, アセトニトリル (ACN) 1mL に溶解し標準溶液とした。実試料 3 種(乾燥植物片)は, 各 10mg を ACN 1mL で抽出し, SFC-MS/MS 分析試料とした。SFC-MS 測定には, ACQUITY UPC²/Xevo TQD (Waters), カラムは UPC² BEH 2-EP (3.0 mm, i.d., x 100 mm 1.7 μ m; Waters), UPC² Trefoil AMY1 (3.0 mm, i.d., x 150 mm 2.5 μ m; Waters), カラム温度は, 40°C, 移動相として, MeOH 含有の CO₂を用いた。

2) ヒト肝ミクロソーム画分を用いた違法ドラッグの代謝研究

ジメチルスルホキシドに溶解した微量の違法ドラッグに, ヒト肝ミクロソーム画分を加え, 60 分間反応後, 遠心分離し, 上清を濃縮後, UPLC-ESI-MS/MS (Waters)にて代謝物を測定した。カラムに ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm, Waters)を使用した。カラム温度 40°C, 移動相には 0.1%ギ酸を含む水と ACN の混合溶媒を用いた。

4. 違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究(栗原)

1) QSAR(定量的活性相関)を中心としたコンピューターモデリングを用いた活性予測手法を検討するために、2D-QSAR(定量的活性相関)法及びファーマコフォアフィンガープリント法の2つの方法で生物活性値の予測を行った。いずれも化学計算パッケージMOEを使った。活性未知化合物の4-エチルメカチノン及び6-APBの予測には、モデル構築のための活性既知類似化学物の活性値として、(+)-アンフェタミン(1 mg/kg)で弁別したラットを用いて般化試験を行った際の構造類似化合物10種類の実測活性値(ED₅₀値)を採用した。また、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種類については、モノアミントランスポーターにおけるドパミン取り込み阻害活性が既知のカチノン系化合物28種類の活性値(IC₅₀値, μM)を採用した。さらに、28種類に加え、7種類の包括範囲外長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物を含む合計35化合物の活性値を組み入れたQSARモデル式を構築し、有用性を検証した。

2) 平成26年に指定薬物に指定された3,4-ジクロロメチルフェニデートは2つの活性中心を有し、4種類の光学異性体が存在する。そのうちトレオ体とエリスロ体について鑑定分析用標品を確保することを目的として合成を行った。3,4-Dichlorobenzyl cyanide に t-BuOK を用いて 2-bromopyridine を反応させ化合物1を合成した。化合物1を濃塩酸で加水分解し、化合物2とした。化合物2にPtO₂を触媒として水素添加を行い、化合物3を合成した。化合物3を濃塩酸で加水分解し化合物4とした。化合物4はシリカゲルクロマトグラフィーで精製(酢酸エチル/メタノール = 4/1)することで *threo*-5, *erythro*-5を得た。それぞれ塩酸塩として再結晶を行いさらに精製を行った。

5. 違法ドラッグの中枢神経シナプス作用に関する薬

理的評価法(関野)

危険ドラッグが持つ中枢作用性を、齧歯類脳組織を用いた *in vitro* 薬理学実験により定量的に評価する方法を開発した。カンナビノイド受容体には、CB₁受容体とCB₂受容体の2種類が存在しており、中枢神経系においては、神経細胞にはCB₁受容体が、ミクログリアにはCB₂受容体が発現している。合成カンナビノイドのCB₁受容体に及ぼす作用についてはマウス小脳スライス標本で神経伝達物質放出に対する抑制作用を測定する事により中枢作用性を評価し、CB₂受容体に及ぼす作用についてはラット初代培養ミクログリアのERKリン酸化パスウェイを用いた実験系で評価した。

1) 3-5週齢のマウス(ICR系)をハロセンで深麻酔後、断頭して安楽死させた。スライス標本は氷冷 Modified Ringer 液[234 (mM) sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose, 95 % O₂, 5 % CO₂] 中で作成し、ACSF(145 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose, 95%O₂-5%CO₂)でインキュベーション後に実験に用いた。電極内液(セシウムクロライドベースの、またはグルコン酸カリウムベース)でプルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。(R)-(+)-WIN 55212, (WIN)と、JWH-018を陽性対照物質としてMAM-2201の作用を比較した。

2) 生後1日齢のWistarラットの脳皮質領域から初代培養ミクログリアを調整した。ディッシュに播種し、血清除去を2時間行い薬剤処置後、氷冷によって反応を停止させた細胞を溶解し、SDS-PAGEによって分離した後、PVDFメンブレンに転写し、CB₁, CB₂, βactin, リン酸化ERK1/2, Total ERK1/2各種特異的抗体を用いて解析を行った。CB₁, CB₂受容体の発現量はβアクチンで補正し、ERKの活性化はリン酸化ERK1, 2をTotal ERK1, 2で補正した。

すべての実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程、及び国立医薬

品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則に従って行った。

6. 違法ドラッグの脳波による作用評価に関する研究(裏出)

危険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等の作用を検出する方法として、薬物投与マウスの自発運動量変化を検討した。また、動物実験用脳波解析システムを用いて、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た。

1) 危険ドラッグのマウス自発運動量に及ぼす作用

平成 24 年度から 26 年度に出現した新規流通合成カンナビノイド計 43 化合物及び陽性対照 JWH-018 (麻薬) を対象とした。各薬物を DMSO/emurphor® EL-620 (GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水 (1/1/18) の溶媒に溶解或いは懸濁させ、マウスに各 5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。投与は暗期開始時刻 (19:00) 直前に行い、1 日目は溶媒単独のコントロールとして、vehicle (溶媒) のみを投与し、2 日目に薬物を投与した (n = 3~4)。マウスは動物行動量測定用チャンバー内の個別のケージに入れ、行動量測定を行った。

2) 危険ドラッグのラットもしくはマウス脳波に及ぼす作用

カチノン系化合物 α -PVP (平成 25 年 3 月より麻薬指定) 及び合成カンナビノイド MAM-2201 (平成 25 年 5 月より麻薬予定) を対象とし、 α -PVP, MAM-2201 を単独、または両化合物を混合したものを、それぞれラットの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。また、平成 24~平成 25 年度違法ドラッグ成分として多くの製品から検出された合成カンナビノイド: QUPIC, 5F-QUPIC, NNEI indazole analog (MN-18) (全て指定薬物) 及び陽性対照 JWH-018 (麻薬) をラットに、平成 26 年度多数の死亡事例を出した 5F-ADB 及び JWH-018 をマウスに腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化に

ついて検討を行った。

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」、筑波大学の動物実験委員会「動物実験に関する指針」、文部科学省のガイドラインおよび動物の愛護および管理に関する法律 (第 105 号) 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。

7. 違法ドラッグの中枢神経系に及ぼす影響評価 (平成 24, 25 年度 和田)

MDMA とその併用が確認されているメタンフェタミン (MP), 比較的最近使用が確認されているメキシセタミンおよびペンチロン・エトカチノンの 3 つの場合において神経薬理的評価を行った。実験動物にこれら薬物を投与し、脳組織における神経伝達アミンであるドパミン (DA) およびセロトニン (5-HT) 濃度に与える影響をマイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出 (HPLC-ECD) 装置を組み合わせた方法により評価した。実験には Wistar 系雄性ラットあるいは ddy 雄性マウスを用いた。

1) 麻酔拘束下のラットを MDMA 単独投与群 (12, 25 mg/kg), MP 単独投与群 (10 mg/kg), MDMA (12 mg/kg) および MP (10 mg/kg) 併用投与群の 4 群に分割した。

2) メキシセタミン 20 mg/kg 投与群および陽性対照としてケタミン 19 mg/kg 投与群とし、麻酔拘束下のマウスに単独投与した。

3) エトカチノンを 2.5, 5, 10 mg/kg およびペンチロンを 5, 10, 17.5, 25 mg/kg の投与群でそれぞれ麻酔拘束下のマウスに単独投与した。

1)~3) について既法のマイクロダイアリシスおよび HPLC-ECD 法¹⁾を用いて脳透析液中の DA および 5-HT 濃度を測定した。

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の下で行った。

8. 植物系違法ドラッグの基原種の特等に関する研究(平成 24, 25 年度 合田, 平成 26 年度 緒方)

危険ドラッグ市場においては、脱法ハーブ製品を含め、植物系違法ドラッグ製品が多数存在している。危険ドラッグ市場に流通する“脱法ハーブ”製品の実態調査を行い、分析情報を収集するとともに、幻覚性成分を含有する植物体の基原種鑑別による塩基配列データの蓄積、幻覚性植物の迅速簡易鑑別法の確立を試みた。

分析対象とする各試料は約 20 mg (乾燥重量)とし、液体窒素で凍結させた後、粉碎した。粉碎した試料は 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。各 200 μ L を回収 DNA 溶液とした。これを鋳型として葉緑体 DNA および核リボゾーム DNA 上の計 5 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を各々使い、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行った。電気泳動によりバンドを確認後、ダイレクトシーケンスを行った。また、一部は、Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用い、クローニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。また、迅速簡易分析法の確立には植物種特異的塩基配列上で 4 種のプライマーを作成し、LoopampDNA 増幅試薬キット(EIKEN Chemical Co., Ltd.)を用い等温条件下での反応を検討した。

C. 結果・考察

1. 違法ドラッグに関する分析情報の収集及び有害影響予測に関する研究(花尻)

1) 指定薬物包括規制前後における違法ドラッグの流通変化について

合成カンナビノイド(平成 25 年 3 月施行)及びカチノン系化合物(平成 26 年 1 月施行)に対する包括規制前後の危険ドラッグ流通変化を検討するために、平成 21 年度後半から 24 年度に入手した危険ドラッグ 1197 製品及び主に平成 25 年度に入手した 887

製品を対象に含有成分を調査した。合成カンナビノイドにおいては、包括規制範囲のパブリックコメント募集後、包括範囲内の新規化合物は市場に登場しておらず、常に流通の主流であったナフトイルインドール骨格を有する新たな化合物の出現はほぼ沈静化した。しかし、従来流通していた化合物とは異なる構造を有する合成カンナビノイドの出現が顕著であり、また、同一製品中から、作用の異なる複数の化合物が検出される事例が増加した。主に平成 25 年度に入手した製品分析の結果において、調査対象期間内に合成カンナビノイド 51、カチノン系化合物 32、その他 25、合計 108 種類の危険ドラッグ成分が検出された。当該年で最も検出数が多かったのは、合成カンナビノイド MAM-2201 及び 5F-QUPIC で、カチノン系化合物ではピロリジニル構造を有する α -PVP、 α -PBP、その他化合物ではチオフェン誘導体の α -PVT であり、また 25I-NBOMe や 2C-C-NBOMe など幻覚作用を有するフェネチルアミン系化合物も多く検出された。カチノン系化合物に関しては、指定薬物や麻薬としての規制後も、市場から完全には消失せず、一部が残留して流通する傾向が見られた。また、合成カンナビノイドと同様、包括規制後、直ちに新たな包括範囲外化合物の出現が認められた。

2) 指定薬物(包括規制含む)、異性体、構造類似関連化合物の TLC、GC-MS 及び LC-PDA-MS による識別法について

対象 154 化合物の TLC 分析において、検討した 2 種類の展開溶媒では十分分離できない化合物も存在した。しかし、GC-MS や LC-MS などの測定データと共に、これら違法ドラッグの TLC 分析データを整備・蓄積することは、指定薬物やその他関連化合物の識別法を検討する上で有用であると考えられた。

包括規制範囲内合成カンナビノイド分析においては、ナフトイルインドール構造を有する化合物は、GC-EI-MS 及び LC-ESI-MS 分析において、フラグメ

ンテーションを起こす部位が決まっている。従って、JWH-018を基準に考えると、どのフラグメントイオンの m/z がどのくらい変化したかを検討すれば、アルキル側鎖、インドール構造、ナフチル構造にどのような置換基が導入されたかが推測できると考えられた。ただし、これら質量分析ではどの位置に置換基が導入されたかまでは推測不可能であるため、推測する構造に相当する分析用標品を用いて確認分析を行うことができない場合は、対応するピークを分取精製して、NMR等で構造を決定する必要があると思われた。

カチノン系化合物異性体分析においては、検討した分析条件で、対象 61 化合物すべてにおいて、GC、LCの保持時間及びGC-EIマススペクトル、UVスペクトルを組み合わせることにより、各異性体を識別することが可能であった。特に、カチノン系化合物のベンゼン環上のメチル基、エチル基、メキシ基、ハロゲン、メチレンジオキシ基などの置換基の位置異性体は、それぞれEIマススペクトルはほぼ同等であったが、UVについては、4位と2位もしくは3位の置換基の違いで異なるスペクトルを示し、UVスペクトルがこれら異性体識別には有用であることが示された。

包括規制範囲内カチノン系化合物分析においては、合成カンナビノイド等の保持時間の長い物質も同時にスクリーニングできるGC-MS条件で、検討した全ての位置異性体どうしの分離が可能であった。また、質量分析における開裂パターンから予測されるフラグメントイオンの出現状況を確認した結果、2-メキシメトカチノン以外は全て当該イオンが確認できた。カチノン類のTFA誘導体については、データを採取した41物質すべてについて、予測通りのフラグメントイオンが確認できた。LC-PDAにおいては、ベンゼン環上の置換基が同じ場合に紫外吸収スペクトルが類似する傾向が認められた。この性質は位置異性体の識別に有用であることが示された。

GC-MS、LC-MS分析上、①テトラメチルシクロプロピル基を有する合成カンナビノイドのGC-MS分析による分解、②カルボン酸エステル構造を有する合成カンナビノイドのGC-MS分析による分解、③一級アミ

ンを有するフェネチルアミン類のGC-MS分析によるホルミル体 $[M+18]^+$ の形成、④NBOHシリーズ化合物のGC-MS分析による2Cシリーズ化合物への分解、⑤3-MeO-PCPのGC-MS分析による分解、⑥メチルフェニデート及びその構造類似化合物のGC-MS分析による分解及び溶液中における異性化、⑦アミノプロピルベンゾフラン構造を有する危険ドラッグの各異性体識別法などに注意が必要であることが示された。また、BiPICANA及びCHMINACA-BAのように、GC-MSでは分析が困難な化合物も存在した。

3) 新規流通違法ドラッグの受容体親和性評価について

合成カンナビノイドの一部構造を有するカルボン酸体を除き、JWH-018及びその他52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CB₁及びCB₂受容体結合能が認められた。構造とCB₁受容体親和性の関係について論じた結果、idole/indazole-carboxamide- methyl 3-methyl butanoate/methyl 3,3-dimethylbutanoate もしくは 3-methylbutanamide/3,3-dimethyl butanamide 構造、indole/indazol-carboxylate ester-naphthyl/quinolinyl 構造を有する化合物は、極めてカンナビノイド CB₁受容体に対する結合親和性が高いことが明らかとなった。また、インドールもしくはインダゾールの *N*-ペンチル基末端にフッ素が導入された化合物は、いずれの構造を有する化合物においてもより高い親和性を示した。さらに、アダマンチル構造を有するAPICA/APINACAを除き、インドール構造よりインダゾール構造を有する化合物の方が、高い親和性を示す傾向にあった。

モノアミン再取り込み阻害作用については、検討した12化合物(エトカチノン含む)のうち、3級アミンである4-メキシ-*N,N*-ジメチルカチノン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、そのドパミン再取り

込み阻害作用は、麻薬エトカチノンの約 30 倍の値を示した。また、 α -PBP 及び α -PVT 等、ピロリジニル基を有する化合物において強いドパミン再取り込み阻害作用が認められた。

2. 違法ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定(内山)

1) 平成 24-26 年度に入手した違法ドラッグ製品中の新規流通違法ドラッグ成分の同定

平成 24 年度から 26 年度に、危険ドラッグ製品 1108 製品を入手し、141 種類の新規流通危険ドラッグ成分(合成カンナビノイド及びその関連化合物 60, フェチルアミン系化合物 18, カチノン系 35, チオフェン系化合物 5, その他化合物 23)を同定した。平成 24 年度においては、合成カンナビノイド包括規制と前後して、indazole-diamide 型や quinolinyl carboxylate 型など、新たな骨格を有する合成カンナビノイドが出現した。また、ピロリジニル基を有する様々なカチノン系化合物が出現した。さらに危険ドラッグの主流である合成カンナビノイドやカチノン系化合物の他に、欧州で死亡事例が報告された興奮性アミンの 5-IAI, 強いセロトニン受容体アゴニスト活性を有するフェネチルアミン系幻覚薬 25I-NBOMe, 2C-C-NBOMe, 25H-NBOMe, 強いオピオイド受容体アゴニスト活性を有する AH-7921 や MT-45 が出現し、危険ドラッグ成分が多様化していることがうかがえた。平成 25 年度においては、carboxamide 型, benzimidazole 型, piperazinyllindole 型などの合成カンナビノイドが出現するとともに、平成 26 年 1 月に施行されたカチノン系化合物包括規制の範囲外化合物が出現した。さらに向精神薬 methylphenidate の構造類似体、強い NMDA 受容体アンタゴニスト活性を有する diphenidine, 米国で多数の死亡事例が報告されたオピオイド受容体アゴニスト acetylfentanyl が出現した。平成 26 年度においては、さらに流通する危険ドラッグ成分の多様化が進んだ。合成カンナビノイドにおいては、特に強い活性を有する methyl

3-methylbutanoate/methyl 3,3-dimethylbutanoate もしくは 3-methylbutanamide/3,3-dimethyl butanamide 構造を有する化合物の流通が顕著で、多くの健康被害が生じた。カチノン系化合物においては包括規制の範囲外である長鎖アルキル鎖を有する化合物やベンゼン環上に複数の置換基を有する化合物、N-アルキル側鎖が分岐している構造を有する化合物の出現が顕著であった。その他、幻覚剤フェンシクリジンのメキシ誘導體、フェネチルアミン系幻覚薬 allylescaline, 25B-NBF, 25C-NBF, チオフェン系化合物 α -PBT 及びカチノン系化合物では 4-fluoro- α -PVP piperidine analog の他、新たな骨格として、benzofuran 型や indane 型を有する化合物が検出された。また、フェネチルアミン系化合物では α -PVP のデオキシ体である prolintane を同定した。さらに、マイナー成分であるが、主成分である 1H-indazole 型の合成カンナビノイドの異性体として 2H-indazole 型の化合物 2 種類が新たに検出された。

2) 卓上型 NMR を用いた ^1H -NMR スペクトルによる異性体識別法の検討

ピペラジン系化合物の位置異性体(ベンゼン環上のオルト, メタ, パラ-フェニル基)は、80 MHz で測定した場合のみ、パラ-フェニル基の位置異性体の識別が可能であった。また、45 MHz, 60 MHz 及び 80 MHz 全てにおいて、アルキル鎖の異なる構造異性体の識別が可能であった(カチノン系化合物及びトリプタミン系化合物)。従って、化合物の種類によるものの、卓上 NMR による異性体識別が可能であることが示された。

3) 大麻主活性成分 Δ^9 -THC 及び合成カンナビノイド 5F-ADB および JWH-018 の神経活動マーカー遺伝子 (*c-fos* m-RNA) 発現への影響

Δ^9 -THC, 5F-ADB 及び JWH-018 において、共通して扁桃体中心核 (CeA) の *c-fos* 発現の上昇を誘発した。また、 Δ^9 -THC とは異なり、5F-ADB, JWH-018

の投与は室傍核(PVN)や視索上核(SO)における顕著な *c-fos* 発現の上昇も誘導した。従って, PVN や SO の *c-fos* 発現を指標にすることで, Δ^9 -THC と 5F-ADB および JWH-018 の作用を区別できると考えられた。さらに, 全脳活動マッピングの結果から, 5F-ADB および JWH-018 は Δ^9 -THC よりも大きな影響を脳活動に与えると推定された。

3. 違法ドラッグの分析に関する研究(豊岡)

1) SFC-MS による合成カンナビノイド類の分析

BEH 2-EP カラム, Trefoil AMY1 カラムのいずれを用いても, 8 種類の合成カンナビノイド類を短時間かつ高感度で分離検出できた。BEH 2-EP カラムでは, *cis* 体, *trans* 体の分離検出はできたが, それらの光学異性体の分離はできなかった。しかしキラルカラムである Trefoil AMY1 により, *cis* 体, *trans* 体のみならずそれらの光学異性体を含めた 4 種すべての分離検出が可能となった。本法を実試料である乾燥植物片中のカンナビノイド類の測定に適用したところ複数の化合物(CCH, JWH-018, JWH-073 等)が検出された。実試料から 4 種の異性体がすべて検出されておりその割合も異なることから, 製造過程や製造場所の特定もできる可能性もある。検出感度も高感度であることから, 血液や尿等の生体試料分析にも応用できるものと考えられる。

2) ヒト肝ミクロソーム画分を用いた違法ドラッグの代謝研究

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, 数種の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は, それぞれの化合物で異なっていた。QUPIC, 5F-QUPIC では, 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化合物が予想された。標品による同定から, インドール酢酸エステル系 2 種では, 加水分解により開裂反応が起こっていることが確認された。 α -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,

様々な位置での水酸化の可能性が示唆された。

以上の結果より, 化合物毎に様々な部位での水酸化が起こることが示唆された。検討した LC-MS/MS 分析のみでは水酸化体の位置を確定するのは困難なため, 標品等を別途合成し構造を確認しなければならない。しかし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。

4. 違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究(栗原)

1) 2D-QSAR (定量的活性相関) 法及びファーマコフォアフィンガープリント法の 2 方法で評価した結果, 4-エチルメカチノン及び 6-APB は, どちらの方法でもこれら規制化合物群と同程度の活性があることが予測された。また, 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 8 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。

さらに, 新規 7 化合物を加えた 35 化合物から構築した QSAR 式を構築し, QSAR 式によって 35 化合物の活性予測値を求めた。前年度までに 28 化合物から構築した旧 QSAR 式によって求めた活性予測と比較した結果, 35 化合物から構築した QSAR 式を用いた場合の方がより, 実測値近い予測値を得られた。

2) 3,4-Dichlorobenzyl cyanide を出発原料として 4 ステップで 3,4-ジクロロメチルフェニデートを合成した。さらに, シリカゲルクロマトグラフィーで精製することで methyl (S)-2-(3,4-dichlorophenyl)-2-((S)-piperidin-2-yl)acetate (*threo-5*) (223mg, 13%) 及び methyl (S)-2-(3,4-dichlorophenyl)-2-((R)-piperidin-2-yl)acetate (*erythro-5*) (257mg, 15%) を得た。また, それぞれ得られた *threo-5* および *erythro-5* に 1M 塩酸メタノールで処理し, 再結晶を行うことで, *threo-5* および *erythro-5* の塩酸塩を得

た。

5. 違法ドラッグの中枢神経シナプス作用に関する薬理的評価法(関野)

1) WIN, JWH-018, MAM-2201 それぞれの登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達に対する IC50 値は, 0.890 μ M (0.296 to 2.68 μ M), 1.12 μ M (0.551 to 2.28 μ M), 0.363 μ M (0.193 to 0.681 μ M), であり, MAM-2201 の IC50 値は JWH-018 の約 1/3 倍であった. MAM-2201 は抑制性ニューロン-プルキンエ細胞間の抑制性シナプス伝達に対しても, 登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達に対してもシナプス前終末に作用して伝達物質の放出抑制作用を示し, 登上線維の入力で生じる複雑スパイクの活動電位発射様式も有意に阻害された.

以上の結果より, 小脳スライス標本で CB1 受容体の作用を定量的に評価し, MAM-2201 が JWH-018 よりも低濃度でシナプス伝達を抑制する事をあきらかにした. この事は, MAM-2201 の人体に対する有害性は既存の危険ドラッグよりも高いことを強く示唆している. MAM-2201 は小脳皮質における種々のシナプス伝達を阻害し, 小脳皮質の出力細胞であるプルキンエ細胞からの情報出力にも影響を与えた. この事は MAM-2201 は人体において小脳依存的な協調運動機能・運動学習機能に影響を与える, という事を示唆している.

2) JWH-015 をラット初代培養ミクログリアに処置し, 用量依存的な ERK1, 2 のリン酸化作用をウェスタンブロット法によって定量的に評価した. JWH015 で 10 分間処置で有意な ERK1, 2 のリン酸化が増加した. さらに 1 および 10 μ M で有意な ERK1, 2 のリン酸化が増加した. さらに, JWH015 による ERK1, 2 のリン酸化は CB2 受容体選択的インバーサゴニストである SR144528 前処置によって有意に抑制された.

以上の結果より, ラット初代培養ミクログリアに機能的な CB2 受容体が発現していること, 初代培養ミクログリアを CB2 受容体選択的アゴニストで刺激すると濃

度依存的な ERK1, 2 のリン酸化が生じることが明らかになった. ウェスタンブロットによる解析ではスループットに欠けるため, 今後, 合成 CB 系危険ドラッグの CB2 受容体を介した薬理作用評価を行うためにスループットを改善した実験系の開発が必要である.

6. 違法ドラッグの脳波による作用評価に関する研究(裏出)

1) 陽性対照 JWH-018 を含む 44 種類の新規流通合成カンナビノイドについてマウスに及ぼす作用を調べた結果, 34 化合物において薬物投与マウスの自発運動量が有意に減少した. 特に, MDMB-CHMINACA は投与後 4 匹中 2 匹が死亡した. また, アミドエステル類は, 陽性対照である JWH-018 以上に強力または同程度の行動量抑制作用を示したが, この結果は, 別途実施した受容体親和性の検討結果に矛盾しないものであった. さらに, 一部の化合物で投与後に痙攣, 歩行失調, 挙尾反応, 四肢の硬直及び無動状態などが観察された.

2) MAM-2201 及びカチノン系化合物 α -PVP を対象とし, 各々を単独, または両化合物を混合したものを, それぞれラットの腹腔内に投与し, 脳波および自発運動量の変化について検討を行った. その結果, 両化合物を混合投与した場合, 投与初期に自発運動量を有意に増加させ, その後有意に減少させた. また, 投与 2 時間後からラットの脳波に有意な変化を与え, その変化は MAM-2201 と類似のスペクトルパターンを示した. 従って, 両化合物を混合投与した場合, 先に α -PVP の作用が発現し, その後遅れて MAM-2201 の作用が発現すると考えられた. 一方, QUPIC, 5F-QUPIC, NNEI indazole analog 及び JWH-018 をラットの腹腔内に投与し, 脳波および自発運動量の変化について検討を行った. その結果, いずれもラットの自発運動量を有意に減少させ, ラットの脳波に JWH-018 と類似したパターンの変化

を与えた。また、5F-ADB 及び JWH-018 を、マウスの腹腔内に投与し、同様に脳波および自発運動量の変化について検討した結果、5F-ADB は投与後、マウスの自発運動量を有意に減少させ、4 匹中 1 匹が死亡した。その抑制作用は JWH-018 より強力であり、さらに長時間にわたり持続した。また、5F-ADB 及び JWH-018 はマウスの脳波パターンに変化を与えたが、両化合物の脳波スペクトルに明らかな共通パターンはみられず、それぞれ自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関はみられなかった。

7. 違法ドラッグの中樞神経系に及ぼす影響評価(平成 24, 25 年度 和田)

1) 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。併用投与群の DA 濃度 (AUC_{0-600} : $243.4 \square M \cdot \text{min}$) が、MDMA 単独投与群 ($29.9 \square M \cdot \text{min}$ for 12 mg/kg; $123.4 \square M \cdot \text{min}$ for 25 mg/kg) と比較して有意に上昇した ($P < 0.05$)。一方、5-HT は併用群では他群と比較して増加傾向を示したが、有意差は見られなかった。MDMA および 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。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れる。

2) メキセタミン投与後の線条体および側坐核における DA および 5-HT 濃度は、投与前と比較して変化は得られなかった。一方、前頭前野では、薬物投与前と比較して投与後には、DA の C_{max} (baseline%) は 5.8 倍 (100.0 ± 29.24 vs 557.9 ± 133.9)、5-HT は 2.8 倍 (100.0 ± 21.77 vs 279.2 ± 117.4) までそれぞれ有意に上昇した ($p < 0.01$) が、ケタミン投与後にはそれらの上昇は認められなかった。この結果より、メキセタミン摂取によって生じる精神障害は前頭前野における脳内モノア

ミンの上昇が強く関与していると考えられる。また、当量のケタミン投与時には前頭前野のモノアミン濃度の変化が見られなかったため、メキセタミンはケタミンと比較して、より強い効果を有すると考える。

3) エトカチノンおよびペンチロン投与により、DA および 5-HT の AUC_{0-110} (baseline% \cdot min) は、投与量の増加とともに増加した。側坐核におけるその増加率はエトカチノンにおいて 2.6~6.5 倍 (DA) および 2.7~10.3 倍 (5-HT) であり、ペンチロンは 1.8~13.4 倍 (DA) および 2.2~5.5 倍 (5-HT) であることを明らかにした。エトカチノンおよびペンチロンのカチノン誘導体はマウス側坐核において DA および 5-HT の濃度上昇を示したことから、依存性に関与することが考えられる。

8. 植物系違法ドラッグの基原種の特等に関する研究(平成 24, 25 年度 合田, 平成 26 年度 緒方)

危険ドラッグ製品中の植物片の DNA 塩基配列を指標とした基原植物同定を行った。70 製品を分析した結果、最も検出された植物種は *Althaea officinalis* (ウスベニタチアオイ) であった *Turnera diffusa* (ダミアナ) は減少傾向にあった。また、*Rubus idaeus* (ラズベリー) を含む製品も多数検出された。大麻などの幻覚性植物は検出されなかった。一方で、依頼を受けた植物種は、*Echinopsis pachanoi* “San Pedro”, *Mimosa tenuiflora* “Jurema”, *Psychotria viridis* “Chacruna” および、*Argyrea nervosa* (ギンバアサガオ) であることが強く示唆され、いずれも幻覚性成分を有する植物種であった。また、*Salvia divinorum* 由来 DNA の目視判定法を検討し、全工程 3 時間程度で検出が可能な簡易分析法を確立した。

危険ドラッグ市場に流通する、いわゆる“脱法ハーブ”の近年の傾向としては、ダミアナの混入が顕著であったが、ウスベニタチアオイが最も検出される植物種であった。また、ラズベリーを含む製品も多数検出された。さらに、黄色花卉、青色花卉のように花卉のみ混入される形態の製品も見られた。使用され

る植物片に製品名、メーカー名を問わず、ある程度の統一性が見られた。大麻やケシなど、国内法規制植物や幻覚性が示唆される植物の混入は見られなかった。一方、依頼植物の分析の結果、国内に幻覚性成分を有する植物が流通されている可能性が示唆され、今後、危険ドラッグ市場への出現が懸念される。また、サルビア・ディビノラム由来 DNA に特異性を示す LAMP プライマーを設計し、本植物体の混入の有無の簡易スクリーニング法として有効な手法であることが示唆された。

D. 結論

1. 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(花尻)

1) 指定薬物包括規制前後における違法ドラッグの流通変化について

危険ドラッグにおいては、指定薬物指定と前後して、直ちに新規構造類似化合物が出現する実態を 2000 製品にも及ぶ製品分析結果から明確に示した。また、平成 25 年 3 月及び平成 26 年 1 月にそれぞれ合成カンナビノイド及びカチノン系化合物の包括規制が施行されたが、包括規制後は、対象となる化合物の新規出現はほとんどなく、直ちに包括規制範囲外化合物が出現する実態も明らかにした。特に合成カンナビノイドにおいては、従来流通していた化合物とは異なる骨格を有する化合物の出現が顕著であり、また、同一製品中から、作用の異なる複数の化合物が検出される事例が増加した。

2) 指定薬物(包括規制含む)、異性体、構造類似関連化合物の TLC, GC-MS 及び LC-PDA-MS による識別法について

指定薬物(包括規制含む)、異性体、構造類似関連化合物の TLC, GC-MS 及び LC-PDA-MS による識別法についてまとめた。特に、合成カンナビノイド及びカチノン系化合物の包括規制範囲内化合物について、GC-MS 及び LC-PDA-MS 分析により、分析用標準品をすべて揃えていなくても予測できるスクリー

ニング法を示した。また、指定薬物について、通常の GC-MS 及び LC-PDA-MS 分析で注意を要する化合物について測定データを取りまとめた。指定薬物総数も 1454 種類(平成 27 年 3 月時点)となったが、その他にも構造類似化合物や異性体が数多く存在し、鑑定分析機関を混乱させている。これらを化合物を明確にかつ迅速に識別できる分析法の開発が重要となっている。

3) 新規流通違法ドラッグの受容体親和性評価について

本研究において、新規流通合成カンナビノイドの中でも特に CB₁ 受容体結合親和性が高い化合物群を明らかにしたが、実際、平成 24 年 3 月にナフトイルインドール構造を有する一部の合成カンナビノイドが包括的に規制された後、平成 25 年度～平成 26 年前半において最も流通が認められ健康被害が報告された 5F-QUPIC, FUB-PB-22 は、いずれも上述の高親和性化合物群に属している。また、平成 26 年 6 月に起きた池袋における自動車暴走事故においては、AB-CHIMINACA 及び 5F-AMB が関与している可能性が考えられており、また 9 月に全国的に複数の死亡事例を引き起こした「Heart shot」と呼ばれる危険ドラッグ製品からは、5F-ADB が検出されている。12 月には、EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction)が、スウェーデンにおいて MDMB-CHMICA による死亡事例を含む複数の健康被害が発生した旨を伝えている。また、MDMB-CHMINACA 5 mg/kg を単回腹腔内投与したマウスにおいて、4 匹中 2 匹が死亡したが、これらの化合物もいずれも CB₁ 受容体結合親和性が高い化合物群に属している。受容体に対する結合親和性は、必ずしもヒトに対する薬理活性の強さを表すものではないが、中枢神経系へ作用を及ぼす蓋然性を評価する上では、指標のひとつとなりうる可能性がある。

2. 違法ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合

物の同定(内山)

1) 平成 24-26 年度に入手した違法ドラッグ製品中の新規流通違法ドラッグ成分の同定

危険ドラッグ流通の主流となっている合成カンナビノイド及びカチノン系化合物について、包括規制が導入された後、包括範囲外の多様な構造を有する化合物が次々と出現した。また、作用の異なる複数の化合物が同一製品中から検出される例が増加しており、予期できない薬理作用を及ぼす可能性も考えられ、健康被害が危惧される。合成カンナビノイド類やカチノン類の他にも、平成 24 年度以降、フェネチルアミン系幻覚薬(セロトニン受容体アゴニスト)である NBOMe シリーズの化合物、オピオイド受容体アゴニストである AH-7921, MT-45 及び acetylfentanyl, NMDA 受容体アンタゴニストである diphenidine 及び methoxydiphenidine, methoxy-PCP 等の危険ドラッグが次々と出現している。これらはいずれも、少量で極めて強い薬理作用を示す化合物である。今後も新しい骨格を有する危険ドラッグの流通が懸念されるため、継続的な実態調査を行い、危険ドラッグ製品の分析及び同定が必要と考えられる。

2) 卓上型 NMR を用いた ^1H -NMR スペクトルによる異性体識別法の検討

卓上型 NMR においては、化合物の種類にはよるものの、従来汎用されている GC-MS や LC-MS 分析での同定が比較的困難な異性体の識別が可能であった。高磁場型 NMR に比べて低感度ではあるが、低価格かつ冷媒や専用設備が不要であるため、汎用型分析機器のひとつとして、乱用薬物の異性体分析への応用の可能性が示唆された。

3) 大麻主活性成分 Δ^9 -THC 及び合成カンナビノイド 5F-ADB および JWH-018 の神経活動マーカー遺伝子(*c-fos* m-RNA)発現への影響

Δ^9 -THC, 5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与は共通して扁桃体中心核(CeA)の *c-fos* 発現の上昇を誘発した。扁桃体は情動を制御する最も重要であると考えら

れている中枢なので、これらの薬剤の投与は情動の異常を誘発する可能性がある。また、これら 3 化合物は同様に CB₁, CB₂ 受容体のアゴニスト作用を有するが、合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB, JWH-018 においては、 Δ^9 -THC では見られなかった室傍核や視索上核における顕著な *c-fos* 発現の上昇も誘導しており、差が認められた。

3. 違法ドラッグの分析に関する研究(豊岡)

SFC-MS/MS を用いることで、アキラルな化合物のみならずキラルな化合物を短時間で分離検出ができた。スループットも高く溶媒の使用量を極端に抑えることができるためコストおよび環境負荷の面でも優れた方法と考えられ、GC-MS や LC-MS に続く第三の方法となり得るものと考えられる。一方、ヒト肝ミクロソームを用いる代謝研究では、微量の化合物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違法ドラッグの代謝予測に繋がるものと期待される。

4. 違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究(栗原)

アンフェタミンで弁別したラットを用いて般化試験を行った際の構造類似化合物 10 種類の活性値(ED₅₀ 値),あるいは、モノアミントランスポーターにおけるドパミン取り込み阻害活性が既知のカチノン系化合物 28 種類の活性値(IC₅₀ 値, μM)を用いて、それぞれ QSAR 式を構築し、活性未知化合物の活性を予測した。さらに、上記 28 種類の既知活性値に加え、7 種類の包括範囲外長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物を含む合計 35 化合物の活性値を組み入れた QSAR モデル式を構築し、有用性を検証した。その結果、より広い構造範囲を有する 35 化合物から構築した QSAR 式を用いた場合の方が、28 化合物から構築したモデル式よりも、実測値に近い予測値を得られた。QSAR を用いた予測法に置いては、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った。

その他、指定薬物の分析用標品を確保することを目的として 3,4-ジクロロメチルフェニデートを合成した。さらに、シリカゲルクロマトグラフィーで精製することで、トレオ体とエリスロ体が調製可能であった。

5. 違法ドラッグの中枢神経シナプス作用に関する薬理的評価法(関野)

マウス小脳スライス標本とパッチクランプ法を組み合わせることで、近年流通が始まった危険ドラッグ MAM-2201 の中枢作用性を定量的に評価できた。この中で、(1) MAM-2201 は JWH-018 よりもより中枢作用性が強力である事と、(2) MAM-2201 は小脳プルキンエ細胞に入力する 3 種類のシナプス入力を阻害し、複雑スパイクの発火様式にも影響を与える事を見いだした。これらの結果は、MAM-2201 は中枢性作用を伴って人体に有害作用を示す事を強く示唆すると共に、日本国内に既に流通し、死亡事例も報告されている MAM-2201 の人体に与える有害作用のメカニズムの理解に重要なデータとなるであろう。

また、ラット初代培養ミクログリアを用いて、CB₂ 受容体を介した ERK1, 2 のリン酸化応答に違いがあることをウェスタンブロット法にて定量的に評価した。今後、スループットの高い実験系を構築し、危険ドラッグとして問題となっている合成カンナビノイド系化合物の CB₂ 受容体を介した中枢機能変調を同定する評価系の構築も目指す。

6. 違法ドラッグの脳波による作用評価に関する研究(裏出)

新規流通合成カンナビノイド 43 種類及び陽性対照 JWH-018 を投与したマウスの自発運動量への影響を検討した結果、80%近い化合物で有意な行動量抑制作用が認められた。また、その作用は、カルボニル類、アミドエステル類 \geq エステル類 \geq ジアミド類 \geq アミド類、また、インダゾール骨格 $>$ インドール骨格(アミド類及びジアミド類の場合)である傾向が見られた。なお、MDMB-CHMINACA は投与後 4 匹中 2 匹が死亡し、一部の化合物で投与後に痙攣、歩行失調、

挙尾反応、四肢の硬直及び無動状態などが観察され、これら薬物による健康被害が懸念された。

近年、ひとつの危険ドラッグ製品中から、興奮作用、鎮静作用、幻覚作用等、異なる作用を有する複数の化合物を検出する事例が増加している。代表的なカチノン系化合物(α -PVP)と合成カンナビノイド(5F-QUPIC)を同時投与したラットにおいては、行動、脳波ともに、 α -PVP の作用が発現し、その後遅れて MAM-2201 の作用が発現すると考えられたが、今後、血中薬物濃度等をさらに検討する必要があると思われる。また、陽性化合物 JWH-018 とともに、新規流通合成カンナビノイド 3 種類をラットに、1 種類をマウスに投与し脳波の変化を検討したところ、前者 3 種類についてはラットの脳波に有意な変化を与え、その脳波パターンは JWH-018 と類似していた。しかし、マウスに投与した 5F-ADB については、脳波変化は認められたが、JWH-018 との類似の脳波パターンは見られなかった。今後、ラットとマウスによる薬物の脳波に及ぼす影響の違い、化合物の構造による影響の違い等を検討する必要がある。

7. 違法ドラッグの中枢神経系に及ぼす影響評価(平成 24, 25 年度 和田)

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。さらにメキセタミン、エトカチノンおよびペンチロンの薬学的評価を行った。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。

8. 植物系違法ドラッグの基原種の特等に関する研究(平成 24, 25 年度 合田, 平成 26 年度 緒方)

危険ドラッグ市場に流通する、いわゆる“脱法ハーブ”と称する植物片を分析した。分析したほとんどの植物が、海外ではハーブティーとして利用されてい