

Zhao *et al.* (2013) reported that in heterologous expression systems using Chinese hamster ovary cells, the surface protein level of R423H mutant hKv3.3 channels is 30% of that of WT hKv3.3 and that the conductance density of the mutant is 16% of that of the WT. Therefore, we cannot exclude the possibility that the reduced surface expression of mKv3.3 channels by the mutation would also contribute to the broadening of action potentials (Fig. 6) and lower firing frequency (Fig. 7) in transduced PCs. However, the reduction of the conductance density cannot be explained fully by the reduced surface protein expression.

To explain the negligible activity and dominant-negative property of R424H mutant channels, we propose two hypothetical mechanisms. First, the positively charged arginine at position 424 in mKv3.3 may be a critical residue in the S4 segment, serving as a part of the voltage sensor domain (Seoh *et al.* 1996). The partial disruption of the sensor domain by R424H mutation would make the subunits less sensitive to membrane voltage changes, resulting in the loss of channel function. Second, an arginine residue at position 174 in the S4 segment of KAT1, which is a voltage-gated K⁺ channel in *Arabidopsis*, plays an essential role in the appropriate

integration of the S3 and S4 segment into the endoplasmic reticulum membrane (Sato *et al.* 2003). Given that the R174 is homologous to R424 in mKv3.3, defective membrane insertion of R424H mutant subunits could occur in *Xenopus* oocytes, leading to a defect in channel activity.

Purkinje cell death by R424H mutant expression and the inhibition by blockade of P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channels

In this study, we revealed that expression of R424H mutant subunits caused cell death and impaired dendritic growth in PCs (Figs 2 and 3) and that these effects were reversed by the blockade of P/Q-type Ca²⁺ channels (Fig. 9). Addition of ω-agatoxin IVA also enhanced dendritic elongation in PCs expressing GFP alone (Fig. 9E and F; filled circles in Fig. 9I and J). Together with a previous report showing that chronic application of TTX in cerebellar cultures caused dendritic elongation in PCs (Schilling *et al.* 1991), activation of P/Q-type Ca²⁺ channels by neuronal activity may adversely influence dendritic elongation in PCs. Addition of ω-agatoxin IVA in R424H mutant-expressing cultures did not completely restore PC survival rates

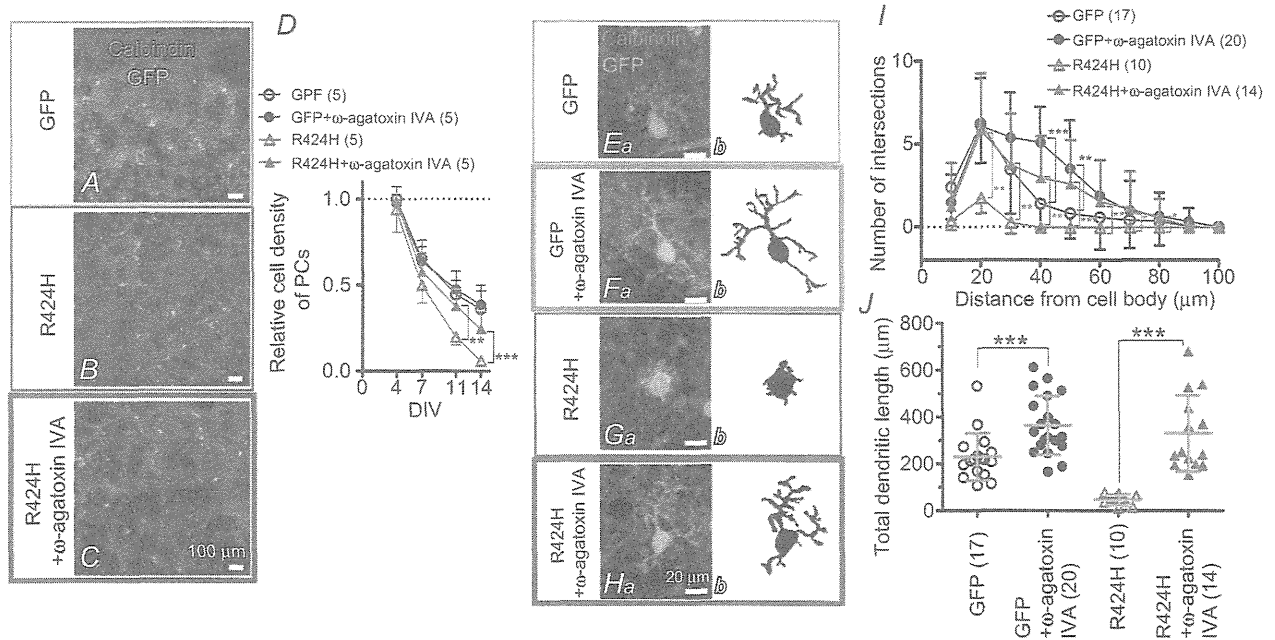


Figure 9. Pharmacological blockade of P/Q-type Ca²⁺ channels rescues the PC death and dendritic maldevelopment caused by expression of R424H mutant
A–C, cerebellar cultures expressing GFP alone (A) or R424H mutant with GFP (B and C). The cultures were immunostained for calbindin at DIV 14. In C, ω-agatoxin IVA was added to the culture medium every other day from DIV 2. D, relative cell density of PCs plotted as a function of DIV. The density was normalized to the value of PCs expressing GFP alone at DIV 4. E–H, calbindin-immunolabelled PCs expressing GFP alone (Ea and Fa) or R424H mutant subunits with GFP (Ga and Ha) at DIV 14. Morphologies of PCs are depicted in the right-hand panels for clarity. In F and H, ω-agatoxin IVA was added. I, and J, summary of dendrite complexity measured by Sholl analysis (I) and of total dendritic length (J). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001.

(Fig. 9D). This may be because some Ca^{2+} currents in cultured PCs are mediated by Ca^{2+} channels other than the P/Q-type (Gillard *et al.* 1997), and activation of these channels may contribute to PC death. We therefore performed the same rescue experiments using CdCl_2 (0.2 mM; a non-selective Ca^{2+} channel blocker) or a combination of ω -agatoxin IVA and verapamil hydrochloride (0.02 mM; an L-type Ca^{2+} channel blocker), but these chemicals markedly deteriorated the viability and development of cerebellar cultures within 3 DIV (data not shown).

In contrast to PCs, there were no significant decreases in the numbers of granule cells upon R424H mutant expression (Fig. 2E). This may be because granule cells do not express endogenous mKv3.3 channels with which R424H mutant subunits form oligomeric channels (Supplemental Fig. S3C), resulting in the absence of the dominant-negative influence on the endogenous channels by the expression of mutant channel subunits.

Comparison with preceding papers on Kv3.3 knockout mice and zebrafish expressing mutant Kv3.3

In contrast to the impaired dendritic development in R424H mutant-expressing PCs (Fig. 3Cb' and D), the cerebellum of Kv3.3 knockout mice shows neither dendritic shrinkage of PCs nor cerebellar atrophy (Zagha *et al.* 2010). Furthermore, the knockout mice display only moderate motor dysfunction and no ataxic phenotype, although SCA13 patients show severe ataxia (Joho *et al.* 2006; Hurlock *et al.* 2008; Waters & Pulst, 2008; Figueroa *et al.* 2010). This difference may be attributable to the following factors. In PCs, mKv3.3 is thought to form heteromultimeric channels by assembling with Kv3.1 and/or Kv3.4 (Goldman-Wohl *et al.* 1994; Weiser *et al.* 1994), and Kv3 channels contribute to repolarization of both somatic Na^+ spikes and dendritic Ca^{2+} spikes (McKay & Turner, 2004). Genetic elimination of Kv3.3 subunits may be insufficient to exhibit the dendritic shrinkage and severe ataxia phenotypes because of functional compensation by Kv3.1 and Kv3.4 in PCs (Goldman-Wohl *et al.* 1994; Weiser *et al.* 1994; Martina *et al.* 2003). We detected the expression of Kv3.4 subunits in cultured PCs (Supplemental Fig. S3D). It is therefore reasonable to hypothesize that R424H mutant subunits form heteromultimeric channels not only with endogenous mKv3.3 but also with other members of Kv3.3, including Kv3.4, resulting in total inhibition of the K^+ channel activity in PCs. This may account for the differences in the morphological phenotypes of PCs in our results *versus* the knockout mice.

Zebrafish expressing infant-onset mutant zebrafish Kv3.3 (homologous to the F448L mutant in SCA13 patients) in spinal motoneurons show defective axonal pathfinding (Issa *et al.*, 2012). Indeed, the zebrafish is an

interesting model for understanding the effects of mutant Kv3.3 expression in spinal motoneurons. However, as they used a motoneuron-specific enhancer of *Mnx1* (*Hb9*) gene, the exogenous proteins were not expressed in the cerebellar neurons. To examine the effects of mutant Kv3.3 in the cerebellum, it would be necessary to express the mutant protein directly in the cerebellar neurons using a different method.

Comparison of our culture results with SCA13 patients harbouring the R423H mutation

Spinocerebellar ataxia type 13 patients harbouring the R423H mutation generally show early-onset, slow-progressive ataxia and cerebellar atrophy (Figueroa *et al.* 2010, 2011). Our immunohistochemical analyses demonstrated that expression of R424H mutant subunits impaired dendritic development and induced cell death in cultured PCs (Figs 2 and 3). Those defects may be responsible for the cerebellar atrophy and ataxia observed in SCA13 patients, although it is necessary to verify that similar impairments are also observed in post-mortem cerebellum of the patients.

In functional aspects, we found that expression of R424H mutant subunits significantly decreased outward current mediated by voltage-gated K^+ channels, reduced sEPSCs, broadened action potentials and altered firing properties (Figs 4–7 and Table 2), suggesting the existence of similar functional changes in SCA13 patients. As PCs are the sole output neurons from the cerebellar cortex and make inhibitory synaptic contacts directly onto neurons in the deep cerebellar nuclei and the vestibular nuclei in the brainstem, PCs play crucial roles in motor co-ordination (Zheng & Raman, 2010). Accordingly, it is easily assumed that the reduction of spontaneous excitatory inputs and the changed firing properties in PCs disrupt synaptic transmission to neurons in the deep cerebellar nuclei and vestibular nuclei, resulting in impaired motor co-ordination. To examine the effects of the R424H mutation on electrophysiological properties of PCs and animal behaviour, we tried expressing R424H mutant subunits in PCs *in vivo* by directly injecting the virus solution into mouse cerebellar cortex as described in our previous papers (Torashima *et al.* 2006, 2008; Shuvaev *et al.* 2011). However, despite the presence of the infection, sufficient overexpression of mKv3.3 channels and apparent ataxia were not observed (data not shown). This may be because endogenous mKv3.3 proteins are abundantly expressed in PCs and the overexpression failed to reach the endogenous protein level. Efficient reduction of K^+ currents in PCs *in vivo* as observed in cultured PCs may be attained by using a different type of viral vector, such as adeno-associated virus vectors (Nathanson *et al.* 2009). Alternatively, K^+ currents in PCs *in vivo* may be effectively decreased using viral vector-mediated

expressions of R424H mutant subunits in *Kv3.3^{-/-}* or *Kv3.3^{+/-}* mice, which express no mKv3.3 proteins or only half the normal amount.

Currently, three different missense mutations in hKv3.3 channels have been reported from distinct pedigrees, and the disease onset and clinical phenotypes also differ among them (Waters *et al.* 2006; Figueroa *et al.* 2010, 2011). In the present study, we focused on only one mutation (R423H in hKv3.3) because of the drastic changes it induced in channel properties in the *Xenopus* oocyte expression system and its early-onset phenotype in SCA13 patients. Further studies of the effects of other mutants (R420H and F448L in hKv3.3) on cultured PCs may provide explanations for the differences in the disease phenotypes.

Possible significance of this study

We developed an *in vitro* SCA13 model using mouse cerebellar cultures and lentivirus vector-mediated gene expression. This model has advantages over *in vivo* models, such as transgenic mice, in the ease of controlling culture conditions by applying chemical compounds. Therefore, this model would be useful in screening drugs for SCA13 and in detailed investigations of the signalling cascades that promote the observed cell death. Given that blockade of P/Q-type Ca²⁺ channels rescued the phenotypes found in this research, the channel blockers may be potential therapeutic drugs for SCA13. Furthermore, this culture method, in combination with virus-mediated gene expression, may be applicable to the study of other types of hereditary spinocerebellar ataxia.

References

- Armstrong CM & Bezanilla F (1974). Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J Gen Physiol* **63**, 533–552.
- Ashcroft FM (2006). From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–447.
- Chang SY, Zaghera E, Kwon ES, Ozaita A, Bobik M, Martone ME, Ellisman MH, Heintz N & Rudy B (2007). Distribution of Kv3.3 potassium channel subunits in distinct neuronal populations of mouse brain. *J Comp Neurol* **502**, 953–972.
- Costa PF, Emilio MG, Fernandes PL, Ferreira HG & Ferreira KG (1989). Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *J Physiol* **413**, 199–211.
- Desai R, Kronengold J, Mei J, Forman SA & Kaczmarek LK (2008). Protein kinase C modulates inactivation of Kv3.3 channels. *J Biol Chem* **283**, 22283–22294.
- Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in *The Journal of Physiology*: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713–719.
- Erisir A, Lau D, Rudy B & Leonard CS (1999). Function of specific K⁺ channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons. *J Neurophysiol* **82**, 2476–2489.
- Figueroa KP, Minassian NA, Stevanin G, Waters M, Garibyan V, Forlani S, Strzelczyk A, Bürk K, Brice A, Dürr A, Papazian DM & Pulst SM (2010). KCNC3: phenotype, mutations, channel biophysics—a study of 260 familial ataxia patients. *Hum Mutat* **31**, 191–196.
- Figueroa KP, Waters MF, Garibyan V, Bird TD, Gomez CM, Ranum LP, Minassian NA, Papazian DM & Pulst SM (2011). Frequency of KCNC3 DNA variants as causes of spinocerebellar ataxia 13 (SCA13). *PLoS One* **6**, e17811.
- Fry M, Boegle AK & Maue RA (2007). Differentiated pattern of sodium channel expression in dissociated Purkinje neurons maintained in long-term culture. *J Neurochem* **101**, 737–748.
- Gillard SE, Volsen SG, Smith W, Beattie RE, Bleakman D & Lodge D (1997). Identification of pore-forming subunit of P-type calcium channels: an antisense study on rat cerebellar Purkinje cells in culture. *Neuropharmacology* **36**, 405–409.
- Gimenez-Cassina A, Lim F & Diaz-Nido J (2007). Gene transfer into Purkinje cells using herpesviral amplicon vectors in cerebellar cultures. *Neurochem Int* **50**, 181–188.
- Goldman-Wohl DS, Chan E, Baird D & Heintz N (1994). Kv3.3b: a novel Shaw type potassium channel expressed in terminally differentiated cerebellar Purkinje cells and deep cerebellar nuclei. *J Neurosci* **14**, 511–522.
- Gryniewicz G, Poenie M & Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440–3450.
- Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, Metzger ME, Krouse A, Donahue RE, Kepes S, Gray J, Dunbar CE, Persons DA & Nienhuis AW (2004). Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* **103**, 4062–4069.
- Harada KH, Ishii TM, Takatsuka K, Koizumi A & Ohmori H (2006). Effects of perfluorooctane sulfonate on action potentials and currents in cultured rat cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 240–245.
- Hawley RG, Lieu FH, Fong AZ & Hawley TS (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther* **1**, 136–138.
- Hille B (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hirai H & Launey T (2000). The regulatory connection between the activity of granule cell NMDA receptors and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* **20**, 5217–5224.
- Hirano T & Kasano K (1993). Spatial distribution of excitatory and inhibitory synapses on a Purkinje cell in a rat cerebellar culture. *J Neurophysiol* **70**, 1316–1325.
- Hirano T, Kubo Y & Wu MM (1986). Cerebellar granule cells in culture: monosynaptic connections with Purkinje cells and ionic currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4957–4961.
- Hodgkin AL & Katz B (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* **108**, 37–77.
- Hurlock EC, McMahon A & Joho RH (2008). Purkinje-cell-restricted restoration of Kv3.3 function restores complex spikes and rescues motor coordination in *Kcnc3* mutants. *J Neurosci* **28**, 4640–4648.

- Issa FA, Mock AF, Sagasti A & Papazian DM (2012). Spinocerebellar ataxia type 13 mutation that is associated with disease onset in infancy disrupts axonal pathfinding during neuronal development. *Dis Model Mech* **5**, 921–929.
- Joho RH, Street C, Matsushita S & Knöpfel T (2006). Behavioral motor dysfunction in Kv3-type potassium channel-deficient mice. *Genes Brain Behav* **5**, 472–482.
- Kim JA, Kang YS, Jung MW, Kang GH, Lee SH & Lee YS (2000). Ca²⁺ influx mediates apoptosis induced by 4-aminopyridine, a K⁺ channel blocker, in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Pharmacology* **60**, 74–81.
- Kubo Y & Murata Y (2001). Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K⁺ channel. *J Physiol* **531**, 645–660.
- Lajdova I, Chorvat D Jr, Spustova V & Chorvatova A (2004). 4-Aminopyridine activates calcium influx through modulation of the pore-forming purinergic receptor in human peripheral blood mononuclear cells. *Can J Physiol Pharmacol* **82**, 50–56.
- McKay BE & Turner RW (2004). Kv3 K⁺ channels enable burst output in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* **20**, 729–739.
- MacKinnon R (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232–235.
- Martina M, Yao GL & Bean BP (2003). Properties and functional role of voltage-dependent potassium channels in dendrites of rat cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* **23**, 5698–5707.
- Mellor JR, Merlo D, Jones A, Wisden W & Randall AD (1998). Mouse cerebellar granule cell differentiation: electrical activity regulates the GABA_A receptor α 6 subunit gene. *J Neurosci* **18**, 2822–2833.
- Mikuni T, Uesaka N, Okuno H, Hirai H, Deisseroth K, Bito H & Kano M (2013). Arc/Arg3.1 is a postsynaptic mediator of activity-dependent synapse elimination in the developing cerebellum. *Neuron* **78**, 1024–1035.
- Minassian NA, Lin MC & Papazian DM (2012). Altered Kv3.3 channel gating in early-onset spinocerebellar ataxia type 13. *J Physiol* **590**, 1599–1614.
- Mintz IM & Bean BP (1993). Block of calcium channels in rat neurons by synthetic omega-Aga-IVA. *Neuropharmacology* **32**, 1161–1169.
- Mullen RJ, Buck CR & Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201–211.
- Nathanson JL, Yanagawa Y, Obata K & Callaway EM (2009). Preferential labelling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropism of adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Neuroscience* **161**, 441–450.
- Orrenius S, Zhiotovskiy B & Nicotera P (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 552–565.
- Rae JL & Shepard AR (2000). Kv3.3 potassium channels in lens epithelium and corneal endothelium. *Exp Eye Res* **70**, 339–348.
- Rudy B & McBain CJ (2001). Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* **24**, 517–526.
- Sato M, Suzuki K, Yamazaki H & Nakanishi S (2005). A pivotal role of calcineurin signalling in development and maturation of postnatal cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5874–5879.
- Sato Y, Sakaguchi M, Goshima S, Nakamura T & Uozumi N (2003). Molecular dissection of the contribution of negatively and positively charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the voltage sensor in the K⁺ channel, KAT1. *J Biol Chem* **278**, 13227–13234.
- Sawada Y, Kajiwara G, Iizuka A, Takayama K, Shuvaev AN, Koyama C & Hirai H (2010). High transgene expression by lentiviral vectors causes maldevelopment of Purkinje cells in vivo. *Cerebellum* **9**, 291–302.
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA & Morgan JI (1991). Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* **7**, 891–902.
- Seoh SA, Sigg D, Papazian DM & Bezanilla F (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* **16**, 1159–1167.
- Sholl DA (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* **87**, 387–406.
- Shuvaev AN, Horiuchi H, Seki T, Goenawan H, Irie T, Iizuka A, Sakai N & Hirai H (2011). Mutant PKC γ in spinocerebellar ataxia type 14 disrupts synapse elimination and long-term depression in Purkinje cells *in vivo*. *J Neurosci* **31**, 14324–14334.
- Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF & Vignali DA (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single ‘self-cleaving’ 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* **22**, 589–594.
- Tabata T, Sawada S, Araki K, Bono Y, Furuya S & Kano M (2000). A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons. *J Neurosci Methods* **104**, 45–53.
- Takayama K, Torashima T, Horiuchi H & Hirai H (2008). Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter. *Neurosci Lett* **443**, 7–11.
- Torashima T, Iizuka A, Horiuchi H, Mitsumura K, Yamasaki M, Koyama C, Takayama K, Iino M, Watanabe M & Hirai H (2009). Rescue of abnormal phenotypes in δ 2 glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the δ 2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci* **30**, 355–365.
- Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H & Hirai H (2008). Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep* **9**, 393–399.
- Torashima T, Okoyama S, Nishizaki T & Hirai H (2006). In vivo transduction of murine cerebellar Purkinje cells by HIV-derived lentiviral vectors. *Brain Res* **1082**, 11–22.

- Wang W, Xiao J, Adachi M, Liu Z & Zhou J (2011). 4-Aminopyridine induces apoptosis of human acute myeloid leukemia cells via increasing $[Ca^{2+}]_i$ through P_2X_7 receptor pathway. *Cell Physiol Biochem* **28**, 199–208.
- Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figueroa KP, Bannister JP, Nolte D, Mock AF, Evidente VG, Fee DB, Müller U, Dürr A, Brice A, Papazian DM & Pulst SM (2006). Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet* **38**, 447–451.
- Waters MF & Pulst SM (2008). SCA13. *Cerebellum* **7**, 165–169.
- Weiser M, Vega-Saenz de Miera E, Kentros C, Moreno H, Franzen L, Hillman D, Baker H & Rudy B (1994). Differential expression of Shaw-related K^+ channels in the rat central nervous system. *J Neurosci* **14**, 949–972.
- Zagha E, Manita S, Ross WN & Rudy B (2010). Dendritic Kv3.3 potassium channels in cerebellar Purkinje cells regulate generation and spatial dynamics of dendritic Ca^{2+} spikes. *J Neurophysiol* **103**, 3516–3525.
- Zhao J, Zhu J & Thornhill WB (2013). Spinocerebellar ataxia-13 Kv3.3 potassium channels: arginine-to-histidine mutations affect both functional and protein expression on the cell surface. *Biochem J* **454**, 259–265.
- Zheng N & Raman IM (2010). Synaptic inhibition, excitation, and plasticity in neurons of the cerebellar nuclei. *Cerebellum* **9**, 56–66.

Additional Information

Competing interests

None declared.

Author contributions

T.I. and H.H. conceived and designed experiments. T.I. and Y.M. performed experiments. T.I. collected and analysed data. T.I., Y.S. and H.H. wrote the paper.

Funding

This work was supported by Health Labour Sciences Research Grant (T.I.), JSPS KAKENHI grant numbers 24790230 (T.I.) and 19670003 (H.H.), and JSPS Funding Program for Next Generation World-Leading Researchers (LS021 to H.H.).

Acknowledgements

The lentiviral vector and MSCV promoter were provided by St Jude Children's Research Hospital and the American National Red Cross, respectively. We thank Dr L. K. Kaczmarek for mouse Kv3.3 cDNA and Dr K. Nakajo for technical advice and valuable comments on electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes.

危険ドラッグの規制と流通実態について

花尻(木倉) 瑠理* Ruri Kikura-Hanajiri

国立医薬品食品衛生研究所

1. はじめに

近年、麻薬や覚せい剤、大麻などの代用として、危険ドラッグと呼ばれる様々な化学物質や植物が法律の規制枠を逃れて販売、乱用されている。危険ドラッグとは、一般に、麻薬及び向精神薬取締法上の「麻薬」または「向精神薬」等として規制されていないが、それらと類似の有害性を有することが疑われる物質（人為的に合成されたもの、天然物及びそれに由来するものを含む）であり、もっぱら人の乱用に供することを目的として製造、販売等されるものを示す（従来、いわゆる「脱法ドラッグ」、「違法ドラッグ」と呼ばれていたが、平成26年7月に、警察庁及び厚生労働省が、危険性の高い薬物であることが理解できるような「脱法ドラッグ」に代わる用語を公募した結果、「危険ドラッグ」が選定された。本稿では、以下「危険ドラッグ」を使用する）、平成23年度頃から急速に危険ドラッグの流通及び健康被害が拡大し、それに対応して様々な規制及び取締りが行われてきた。警察庁の調査では、平成26年1月から11月までに危険ドラッグが関与した死亡事例が111名と発表されているが、明確に報告されていない事例も含めると、その件数はさらに増大すると考えられる。

本稿では、指定薬物指定による規制と危険ドラッ

グ流通実態の変化について論じると共に、これら化合物の海外における規制状況と情報共有化についても簡単に解説する。なお、平成26年11月25日に、薬事法等の一部を改正する法律が施行され、薬事法の名称が「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）となったが、本稿では「薬事法」で統一して記載した。

2. 指定薬物制度と危険ドラッグの流通実態の移り変わり

2.1 指定薬物制度の制定¹⁾

いわゆる「脱法ドラッグ」と呼ばれた化合物の流通が顕在化したのは、平成10年前後からである。指定薬物制度が制定された平成19年以前に流通していた化合物の主流は *Salvia divinorum* 等の幻覚成分を含む植物、5-MeO-DIPT (FOXY: *N,N*-diisopropyl-5-methoxytryptamine, 平成17年4月麻薬として規制) 等のトリプタミン類、2C-T-7 (2-[2,5-dimethoxy-(4-propylsulfanyl)phenyl]ethanamine, 平成18年4月麻薬として規制) 等のフェネチルアミン類及びBZP (1-benzylpiperazine, 平成15年10月麻薬として規制) 等のピペラジン類等であった(図1)。また、RUSH等の名で知られた亜硝酸エステル類も広く流通した。これら化合物を含む製品は、錠剤等固形型、粉末、液体、カプセル等様々な形態で販売され、*Salvia divinorum* のように、実際に向精神活性を有する成分を含有している植物（粉末、乾燥細片、樹脂、種子等）も様々な種類が販売された。比較的安価で、繁華街の路上やアダルトショップ、インターネットなどで容易に入手が可能であっ

*国立医薬品食品衛生研究所生薬部第3室室長、1990年千葉大学大学院薬学専攻修了(1998年薬学博士)、2000年科学技術庁長期在外派遣研究員(米国カンザス大学)、2009年日本法中毒学会吉村賞受賞。趣味:おいしいものと温泉。一言:ヤクヅツはダメ。ゼツタイ。研究テーマ:分析化学、乱用薬物。連絡先:〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 E-mail: kikura@nihs.go.jp

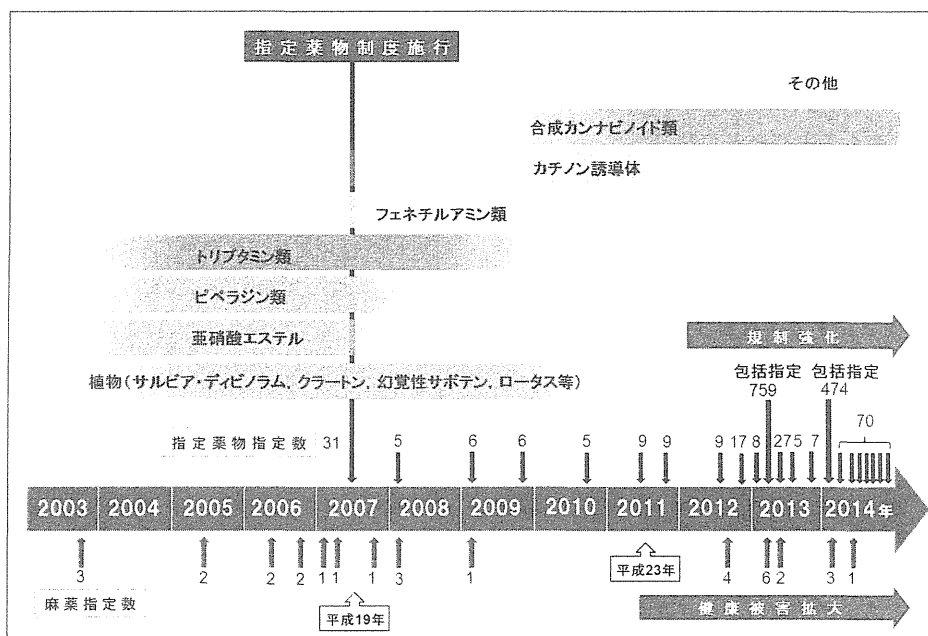


図1 日本における過去12年間の危険ドラッグの規制と流通実態の変化

たことから、特に青少年の間で蔓延し、健康被害や社会的弊害が大きな問題となった。

これらの問題に対処すべく、平成18年に薬事法が改正され、新しく指定薬物制度が導入された。指定薬物とは、中枢神経系の興奮もしくは抑制または幻覚の作用を有する蓋然性が高く、かつ、人の体で使用された場合に保健衛生上の危害が発生するおそれがある薬物や植物であり、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するものである。指定薬物に指定されると、①医療等の正規用途以外の製造、輸入、販売等の禁止、②広告の制限、③厚生労働大臣または都道府県知事による指定薬物の疑いがある物品に対する検査命令、④違反行為に対する罰則の強化等の処置が可能となる。指定薬物制度導入により、従来の薬事法では十分対応しきれなかった危険ドラッグに対し、規制根拠が明確化され、用途の標榜等の如何にかかわらず確実な規制ができるようになった。また、中枢神経系への作用を有する可能性が高く、危害発生のおそれがある段階での指定が可能であるため、科学的実証データが揃わないと指定ができない「麻薬」とは異なり、迅速に流通を規制することが可能となった。本薬事法改正をうけ、平成19年4月に31物質（植物 *Salvia divinorum* 及びその活性成分であるサルビノリンAを含む）が最初に指定薬物として規制された。

2.2 いわゆる「脱法ハーブ」「アロマリキッド」の出現²⁻⁴⁾

平成19年に薬事法下に指定薬物制度が施行され、路上やインターネット等における違法ドラッグ販売数は一時期表面上減少した。しかし、近年、医薬品開発途上でメディシナルケミストリーによって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いる。特に、カンナビノイド受容体に強い活性を示す化合物群（合成カンナビノイド類）を乾燥植物細片に混合した、大麻と類似の作用を標榜して販売されるいわゆる「脱法ハーブ」や、「アロマリキッド」（液体）、「パウダー」（粉末）等として販売される興奮性アミン類（カチノン類）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（図1）。

平成21年11月に合成カンナビノイド類として初めて薬事法下で3化合物が指定薬物として規制されて以来、平成26年11月末時点で、包括指定で規制された化合物を除き、合計80種類の合成カンナビノイドが指定薬物として規制されている。特に平成25年度以降は構造の多様化が進んでおり、インダロール、カルボキサミド、キノリニルカルボキシレート等の構造を有する合成カンナビノイド類が次々と市場に出現している。なお、いわゆる「脱法ハーブ」製品は、乾燥植物細片に合成化合物が添加されてい

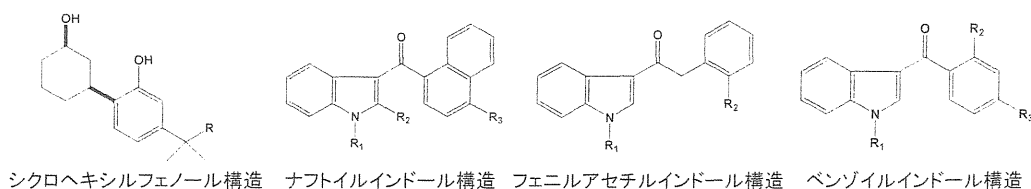
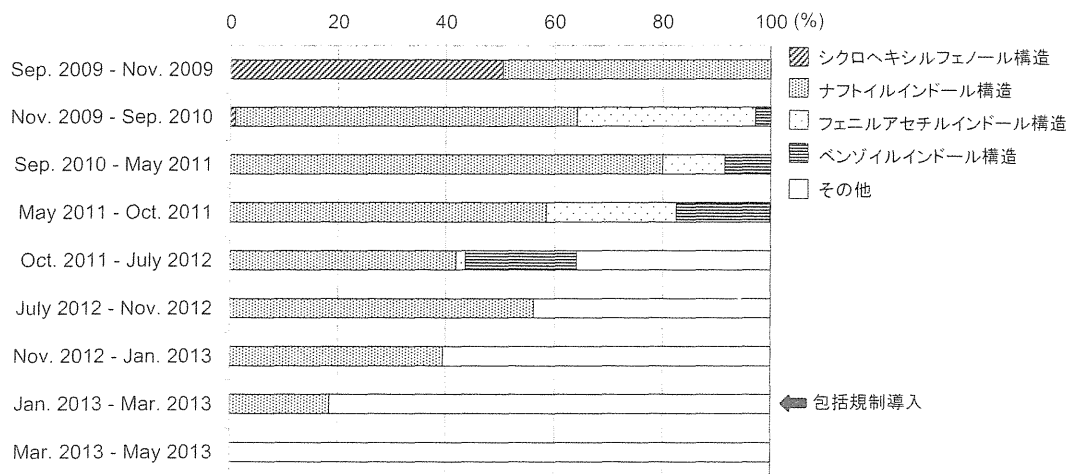


図2 合成カンナビノイド類の包括規制導入前後における流通変化

る場合が多いが、使用されている植物についての情報は極めて乏しい。我々は、合成カンナビノイドを含有する「脱法ハーブ」製品について、含有植物細片の遺伝子分析を行い、使用されている植物の基原種調査を行っている。その結果、含有植物は、製品の包装に表示されていた植物名とは異なり、向精神活性が報告されている植物は、ほとんどの場合で含有していないことが明らかとなっている。すなわち、植物自体は、合成化合物の賦形剤のような役割で使用されているものと考えられる。

一方、カチノンはもともと東アフリカやアラビア半島で酒の代用嗜好品として使用されるニシキギ科植物カート (*Catha edulis*) の主活性分であり、覚せい剤様の興奮作用を示す。カチノン類についても、ベンゼン環上にハロゲンやメチル基、メトキシ基等が導入された構造、フェニルプロパン骨格のアルキル鎖がC₃からC₉まで延長した構造、N-アルキル鎖が延長した構造、ピロリジニル基が導入された構造等、様々に修飾された化合物が次々と出現している。特に、 α -PVP (1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one) など、ピロリジニル基が導入された化合物は、モノアミントランスポーターに結合し、モノアミンの取り込みを阻害する作用が強く、世界的にも被害事例報告が多い。

これら危険ドラッグにおいては、規制を逃れるため、含有成分が指定薬物に指定されると、速やかに構造類似化合物に置換して販売されるため、流通と規制との「いたちごっこ」が続いている。この状況を打破すべく、平成25年3月に、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（既規制化合物を除く）に対し、薬事法下で初めて包括規制が導入された。さらに、平成26年1月には、カチノン構造に特定の置換基を有する化合物群474化合物（既規制化合物を除く）についても、包括的に新たに規制が導入された。図2に包括規制前後における合成カンナビノイド類の流通の移り変わりを示す。我々の試買調査では、平成23年度前半には流通する合成カンナビノイドの60%以上を占めていたナフトイルインドール構造を有する化合物は、包括規制施行後に市場からほとんどが姿を消し、包括規制の効果が認められた。しかし一方で、新たな構造を有する化合物の出現が直ちに認められており、規制前に主に検出されていた合成カンナビノイド類は、その他の新たな構造を有する化合物群に完全に置き換わっていた。残念ながら、「いたちごっこ」状態は、いまだ続いていると考えられる。

なお、合成カンナビノイドやカチノン類の他にも、

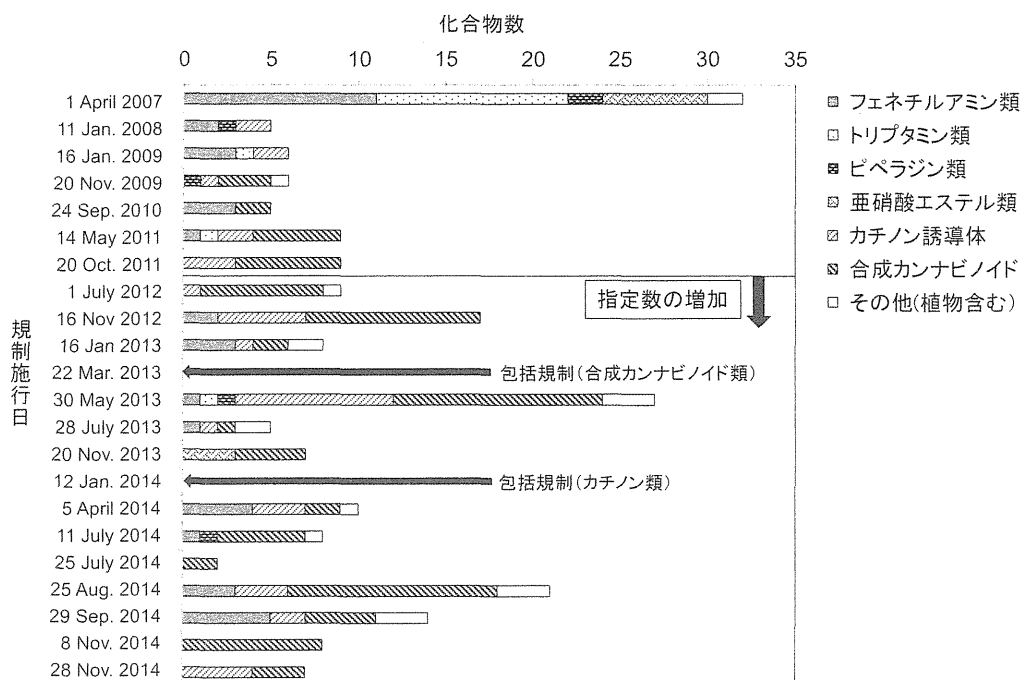


図3 指定薬物指定数の推移

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及びアセチルフェンタニル、NMDA受容体アンタゴニストであるジフェニジン及びメトキシフェンシクリジン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。NBOMeシリーズの化合物については、切手状の小紙片に化合物を染みこませた形態の製品も確認されており、従来のいわゆる「脱法ドラッグ」の枠を超えたものとなっている。

2.3 危険ドラッグに対する規制強化

平成23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著しく増加している。平成24年度に、厚生労働省は、国、都道府県等が連携して監視・取締りを行えるような体制作りをすすめるとともに、流通と規制の「いたちごっこ」的状況を打破すべく、①指定薬物指定の迅速化（薬事・食品衛生審議会指定薬物部会開催頻度を増加、海外での流通・規制実態を踏まえた指定の前倒し化）、②構造類似体を一括して取り締まりの対象に指定する包括指定の手法の検討を行う、等の方針を打ち出した。また、乱用実態や依存性等の中樞毒性が確認

された指定薬物については、依存性薬物検討会を随時開催し、より厳しい規制区分である麻薬への指定を積極的に行うとした。これをうけて、平成24年度以降においては危険ドラッグの規制化が急速に進んだ（図3）。また、上述した通り、平成24年度及び25年度に2種類の構造を対象として薬事法下で初めて包括指定を導入すると共に、麻薬取締官及び麻薬取締員に薬事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を行い、平成25年10月1日より施行した。さらに、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を行い、平成26年4月1日に施行した。

しかしながら、このような規制強化の中にあっても、危険ドラッグが関与した被害事例は後を絶たない。平成26年6月末には、池袋において、危険ドラッグが関与した自動車暴走事件が発生し犠牲者が出た。厚生労働省は、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7月に実施した。その後も11月末までに4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ている。その間に規制された化合物の中に

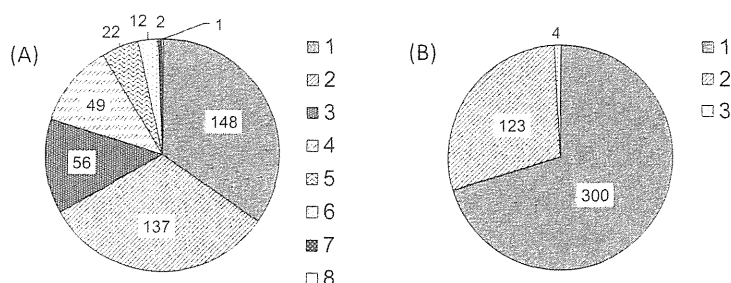


図4 2013年にインターネットを介して試買した危険ドラッグ427製品において、(A) 1製品中から検出された危険ドラッグ成分の数、及び(B) 1製品中から検出された異なる薬効を有する危険ドラッグ成分の種類数

は、平成26年9月中旬から10月前半にかけて、全国で複数の死亡事例に関与した「ハートショット」と呼ばれる製品に含有されていた危険ドラッグ成分も含まれる。その結果、平成26年11月末時点で指定薬物総数は1,429物質となった。主な構造別に分類すると、包括指定で規制された化合物を除き、個別で指定された化合物においては、亜硝酸エステル類3.1%、トリプタミン類6.6%、ピペラジン類3.1%、フェネチルアミン類18.4%、カチノン類19.9%、合成カンナビノイド40.8%、その他8.2%となる。なお、全体の約96%、1,372物質が平成24年度以降の指定である(図3)。さらに平成26年8月末には、厚生労働省地方厚生局、都府県等が指定薬物の販売の可能性がある店舗に対し初の検査命令を行い、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た。危険ドラッグに対する無承認無許可医薬品としての指導取締り強化についても、厚生労働省医薬食品局長通知として各都道府県に周知されているところである。

3. 危険ドラッグはなぜ危険なのか？

上述した通り、危険ドラッグが関与した被害事例は後を絶たない。危険ドラッグ製品が内包する危険性として、主に以下の3点が考えられる。

(i) 何がどれだけ入っているかわからない。

製品中にどのような化合物が含まれているか不明であることが多く、同じ名称、同じ包装形態の製品でも、含有化合物の種類や量が異なる場合がある。また、製品によっては複数の化合物を含有しており、鎮静、興奮、幻覚など、薬理作用が異なる複数の薬物が混在している場合も多い。そのため、実際に人が摂取した場合どのような作用を及ぼすのか予測が

困難である。図4に、平成25年度に国立医薬品食品衛生研究所においてインターネットを介して試買した427製品において、1製品中から検出された化合物数及び1製品中から検出された異なる薬効を有する危険ドラッグの種類数を記載した。平成25年度においては、試買した製品の約65%で1製品中から複数の化合物が検出され、8化合物が検出された製品も存在した。また、約30%の製品において、薬効の異なる(例えば興奮と鎮静等)複数の成分が検出された。

(ii) 実際の薬理作用が不明の化合物が多い。

新規に検出される危険ドラッグ成分の多くは、薬理活性が未知の化合物である。規制を逃れるために化学構造を一部修飾しているうちに、予想外の薬理活性を有する化合物が登場する可能性も考えられる。また、合成原料、合成副生成物や反応生成物(複数の含有化合物が製品調製中に反応して生成した化合物など)、分解物などが製品から検出される場合もあるが、それら「不純物」の薬理作用はまったく予測できない。急性毒性だけではなく、発がん性を有する化合物が存在する可能性も否定できない。さらに、流通化合物の移り変わりが早いため、危険ドラッグによる健康被害に対し、病院側で原因化合物を特定することが困難であり、治療法も確立されていない。依存性が確認されている化合物も多く、「合法」「脱法」を標榜して販売されているため、興味本位で手を出すと、いつのまにかやめることができない状況に陥ることもありえる。

(iii) 既存の規制薬物よりも活性が強い薬物も存在する

近年流通する合成カンナビノイドの多くは、標的部位であるカンナビノイドCB₁受容体に対し、大麻

の活性成分 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (Δ^9 -THC) よりも強い親和性を有することが明らかとなっている。例えば、大麻の活性成分 Δ^9 -THC は、カンナビノイド CB₁ 受容体に対し Ki 値が 41 nM であることが報告されている。一方、各化合物の特許情報によると、代表的な合成カンナビノイド JWH-018 (naphthalen-1-yl(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone, 平成 24 年 8 月より麻薬として規制) は 9.0 nM、平成 26 年 7 月に指定薬物に緊急指定された AB-CHMINACA (N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-1H-indazole-3-carboxamide) は 0.9 nM である。測定条件が異なるため単純には比較できないが、AB-CHMINACA のカンナビノイド CB₁ 受容体に対する親和性は、 Δ^9 -THC よりも 45 倍程度強いことになる。

4. 海外の規制状況と情報の共有化

危険ドラッグの流通及び健康被害の拡大については、欧米諸国でも大きな問題となっており、規制化が進んでいる。規制化の手法としては、「個別指定」の他に、主に「包括規制」及び「アナログ規制」等が存在する。個別指定は、個々の化合物について規制を行う手法であり、通常の規制法の他に、主に米国や英国等で取り入れられている暫定規制とスウェーデン等で取り入れられている緊急指定が存在する。暫定規制は、まずは暫定的に問題となる化合物を規制し、暫定期間内に有害性に関する情報を集めて、その後も継続的に規制すべきか否かを検討する手法である。包括規制は日本においても導入されたが、英国による規制が有名であり、特定の構造を有する化合物に対して一括して規制や摘発を行うことができる手法である。アナログ規制は、それとは別に、米国やカナダなどで行われており、既に規制されている化合物と構造及び薬理活性が類似している化合物に対して規制対象とみなすというものであり、その当否は裁判で争われる。

なお、次から次へと新規流通化合物が出現する危険ドラッグにおいては、国内外の研究機関間における情報の共有化が重要となる。欧州連合 (EU) においては、危険ドラッグに対し、組織的に情報収集及び規制化への取組を行っている。EU の加盟国と周辺諸国を合わせた 30 カ国において、早期警戒システム (Early-warning system, EWS) を構築し、新

規流通化合物が検出された場合、欧州薬物・薬物乱用モニタリングセンター (European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction, EMCDDA) 及び欧州刑事警察機構 (Europol) にそれらのデータが集約される。こうした情報は年に 1 回、EMCDDA と Europol のジョイントレポートとしてまとめられ、公開されている (<http://www.emcdda.europa.eu/>)。その後、問題となる化合物についてリスクアセスメントがまとめられ、欧州委員会において規制すべきか否かの判断が下される。規制することが決定すると、各国の法律ごとに規制の方法は異なるものの、EU 諸国の中でおしなべて規制化が行われる。また、国連薬物犯罪事務所 (United Nations Office on Drugs and Crime, UNDOC) においても、早期警戒報告 (Early Warning Advisory, EWA) をウェブ上で公開しており (<https://www.unodc.org/LSS/Home/NPS>)、各国における危険ドラッグの出現・流通状況や規制情報が掲載されている。

国立医薬品食品衛生研究所では、2014 年 3 月より「違法ドラッグデータ閲覧システム」を公開している (<http://npsdb.nihs.go.jp/Search/>)。本システムでは、指定薬物やその構造類似体、また今後流通が予想される危険ドラッグ成分について、化合物名 (一般名、通称、IUPAC 名)、CAS 番号、分子式、分子量、モノアイソトピック質量、GC-EI-MS の代表的なフラグメントイオン、LC-ESI-MS のプロトン付加分子イオン及び代表的なフラグメントイオン等から化合物情報が検索可能である。また、これら化合物を含有する危険ドラッグ製品情報も検索可能となっている。各分析データは、UNODC などの国際機関にも提供している。2014 年 11 月末時点で、633 化合物、1964 製品の情報が記載されており、国内 260 機関 (部署)、海外 17 機関 (部署) が登録をしている。本データベースは、主に国内外の公的分析機関 (都道府県の地方衛生研究所、警察、病院等) 及び衛生裁判化学、法医学教室等の大学研究室に所属する研究者を対象とした事前登録制となっているので、興味をお持ちの方がいたら、上述したウェブページから登録をお願いしたい。

5. おわりに

本稿においては個々の危険ドラッグについては言及していないが、もともとは医薬品開発目的として、

ある特定の受容体などをターゲットとして数百単位で誕生した化合物群の一部が危険ドラッグ市場に流出したものが多く、従って、規制された化合物に代わって、今後も新たな化合物が次々と出現することが予想される。大多数の人にとって薬物乱用問題は他人事と考えられているが、「合法ドラッグ」「脱法ドラッグ」を標榜し、店舗やインターネットなどを介して、今まで薬物とは縁がなかった人々の間に広く流通した「危険ドラッグ」の現状を鑑みると、決して関係のない話ではすまされない。購入する人がいるから販売する人もいる。まずは危険ドラッグの危険性に関する正しい知識の普及、また特に青少年が興味本位に危険ドラッグに手を出さないための取り組みが重要である。また、それと共に、薬物から抜け出せなくなってしまった乱用者のための治療法の確立及び治療施設の拡充も重要だと思われる。これら危険ドラッグ含有製品による健康危害を防止す

るために、今後も継続的に新規危険ドラッグの出現を監視し、迅速な規制化・取締りを行うことが可能となる科学的データを地道に蓄積していくことが必要である。

引用文献

- 1) 花尻 (木倉) 瑠理, 日本における違法ドラッグ対策—指定薬物制度について—, *ファルマシア*, **44**, 1177–1182 (2008).
- 2) R. Kikura-Hanajiri, N. Uchiyama, Y. Goda, Survey of current trends in the abuse of psychotropic substances and plants in Japan, *Leg. Med.*, **13**, 109–115 (2011).
- 3) 花尻 (木倉) 瑠理, 内山奈穂子, 河村麻衣子, 緒方 潤, 合田幸広, 違法ドラッグを取り巻く国内外における現状と規制について, *薬学雑誌*, **133**, 31–40 (2013).
- 4) R. Kikura-Hanajiri, N. Uchiyama, M. Kawamura, Y. Goda, Changes in the prevalence of new psychoactive substances before and after the introduction of the generic scheduling of synthetic cannabinoids in Japan, *Drug Test. Anal.*, **6**, 832–839 (2014).

聴覚障害者のコミュニケーションツール



過日、ある展示会で聴覚障害者用のコミュニケーションツールに目が行った。タブレットに手書きで文字を書いて筆談で先方に意思を伝えることができ、相手が健常者の場合には、そのタブレットのマイク機能に直接話しかけることにより、その音声を認識し、瞬時に文字に変換されて表れるすぐれ物である。

音声認識はもちろん変換ミスもあるようだが、ほぼリアルタイムで文字変換されるので、ここまで進んでいることに感動した。聴覚障害者にとっては手話を知らない健常者とのコミュニケーションが、筆談と音声認識文字入力によりリアルタイムで図れることで、人とのつながりや行動範囲が広がるのが、大きなメリットとなっているようだ。手持ちのスマートフォンやタブレットにアプリを入れれば利用可能とのこと、それほど新たな費用もかからないようだ。

また、アプリ以外にも聴覚障害者向けのサービスとしてテレビ電話による遠隔通訳システムの利用も普及しつつあり、ガス漏れに気づいた利用者

が、テレビ電話で現地から 300 km 離れたサービスセンターへ手話で連絡し、センターから消防署へ電話連絡して事なきを得た事例もあるとのこと、日常的にもお店やサービスカウンターの窓口にテレビ電話が設置され、聴覚障害者への応対ができるように遠隔通訳サービスが進展しつつあるようだ。

さらに、会議を円滑にできるシステムもあり、スマートフォン、タブレット、PC などを持ち寄り、健常者が音声入力で発言すると、文字変換される。これに対して聴覚障害者はアプリ上で手書き、またはキーボード入力で議論を行うというものである。名乗ってから発言を始め、途中で発言を遮らないなどのルールは、健常者だけの会議においても有用であり、かつ、そのまま会議録として文字情報での保管が可能となる。

以上、コミュニケーションのバリアフリー化が確実に進展していることを知った展示会であった。

参考： <http://www.plusvoice.co.jp/> (S. T.)

A synthetic cannabinoid FDU-NNEI, two 2*H*-indazole isomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and NNEI indazole analog (MN-18), a phenethylamine derivative *N*-OH-EDMA, and a cathinone derivative dimethoxy- α -PHP, newly identified in illegal products

Nahoko Uchiyama · Yoshihiko Shimokawa ·
Ruri Kikura-Hanajiri · Yosuke Demizu ·
Yukihiro Goda · Takashi Hakamatsuka

Received: 26 December 2014 / Accepted: 20 January 2015
© Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer Japan 2015

Abstract Six new psychoactive substances were identified together with two other substances (compounds 1–8) in illegal products by our ongoing survey in Japan between January and July 2014. A new synthetic cannabinoid, FDU-NNEI [1-(4-fluorobenzyl)-*N*-(naphthalen-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide, 2], was detected with the newly distributed synthetic cannabinoid FDU-PB-22 (1). Two 2*H*-indazole isomers of synthetic cannabinoids, AB-CHMINACA 2*H*-indazole analog (3) and NNEI 2*H*-indazole analog (4), were newly identified with 1*H*-indazoles [AB-CHMINACA and NNEI indazole analog (MN-18)]. In addition, 2-methylpropyl *N*-(naphthalen-1-yl) carbamate (5) and isobutyl 1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxylate (6) were detected in illegal products. Compound 6 is considered to be a by-product of the preparation of NNEI indazole analog from compound 5 and 1-pentyl-1*H*-indazole. A phenethylamine derivative, *N*-OH-EDMA [*N*-hydroxy-3,4-ethylenedioxy-*N*-methylamphetamines, 7], and a cathinone derivative, dimethoxy- α -PHP (dimethoxy- α -pyrrolidinohexanophenone, 8), were newly identified in illegal products. Among them, compounds 1 and 8 have been controlled as designated substances (Shitei-Yakubutsu) under the Pharmaceutical Affairs Law in Japan since August and November 2014, respectively.

Keywords 2*H*-indazole isomer · Synthetic cannabinoid · FDU-NNEI · *N*-OH-EDMA · Dimethoxy- α -PHP · Cathinone derivative

N. Uchiyama (✉) · Y. Shimokawa · R. Kikura-Hanajiri ·
Y. Demizu · Y. Goda · T. Hakamatsuka
Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics,
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
e-mail: nuchiyama@nihs.go.jp

Introduction

The consumption of new psychoactive substances (NPSs) including synthetic cannabinoids and cathinone derivatives has become widespread despite regulatory control measures [1–7]. The EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) reported that 81 NPSs were identified by the EU early warning system in 2013, with 37 NPSs reported from January to May 2014 [2]. Ninety-seven NPSs were reported to the UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) in 2013 alone [3].

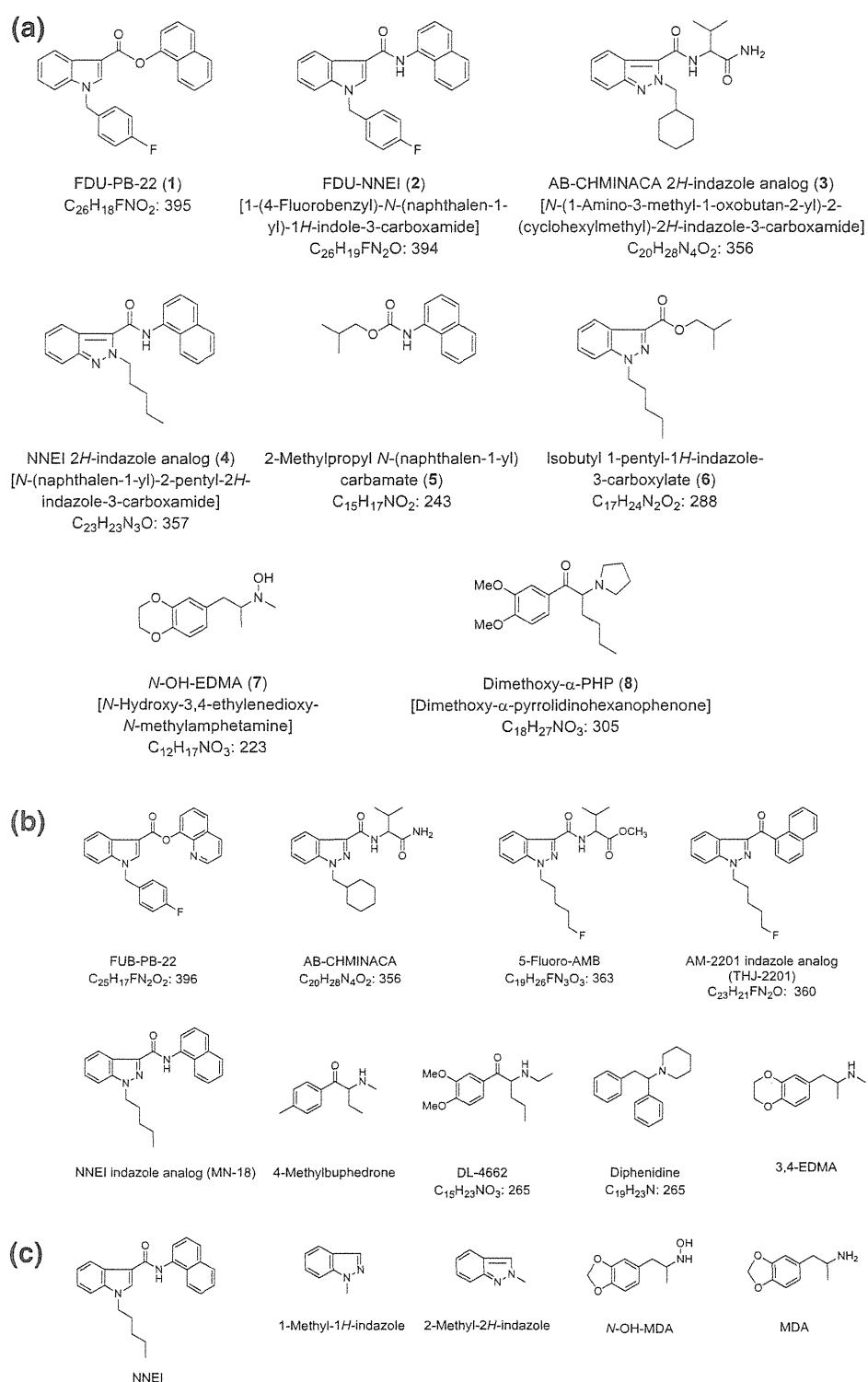
We previously reported the appearance of 45 newly distributed substances in Japan between January 2013 and May 2014, by our ongoing survey of NPSs in the illegal drug market in Japan [8–10]. The detected compounds were 18 synthetic cannabinoids, 13 cathinone derivatives, five phenethylamines, and nine other substances, including the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) channel blocker diphenidine [8–10]. In the present study, we describe the identification of eight newly distributed compounds: four synthetic cannabinoids (1–4), two other substances (5 and 6), a phenethylamine derivative (7), and a cathinone derivative (8) in illegal products purchased from January to July 2014 (Fig. 1a).

Materials and methods

Samples for analyses

The analyzed samples were purchased via the Internet between January and July 2014 as 241 chemical-type or herbal-type products being sold in Japan. Among them, we

Fig. 1 Structures of the newly detected compounds (1–8, a), detected, but known compounds (b), and related compounds (c)



show the analysis data of five products (A–E) for describing the identification of compounds 1–8 in this paper. Each of the herbal-type products (A–D) contained

approximately 3 g of mixed dried plants. The single powder-type product called “fragrance powder” consisted of 400 mg of a brown powder (E).

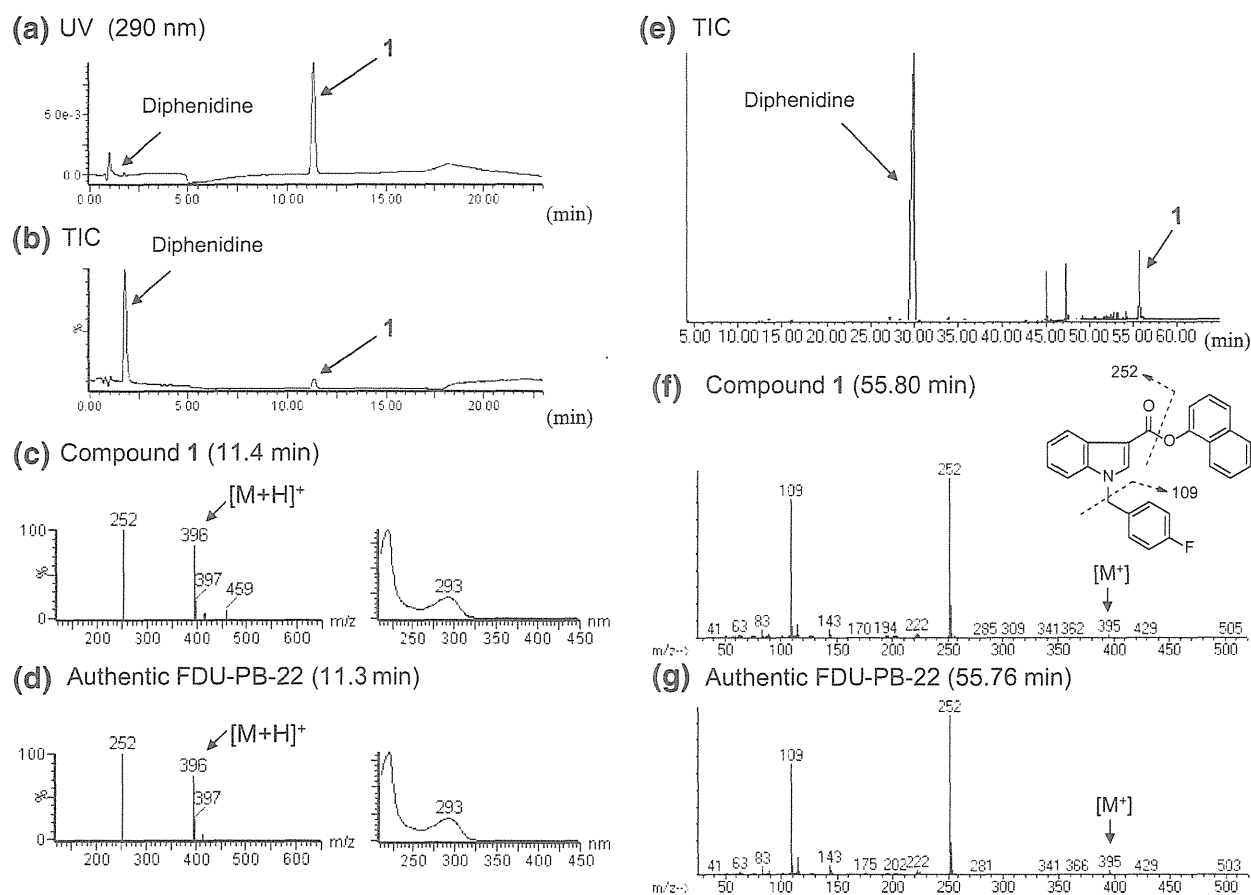


Fig. 2 Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analyses of product A. The liquid chromatography–ultraviolet–photodiode array (LC–UV–PDA) chromatogram (a), total ion chromatogram (TIC) (b), and

electrospray ionization (ESI) mass and ultraviolet (UV) spectra of peaks **1** (c) and the authentic FDU-PB-22 (d) are shown. TIC (e), electron ionization (EI) mass spectra of peaks **1** (f) and the authentic FDU-PB-22 (g) obtained by GC–MS are also shown

Chemicals and reagents

FDU-PB-22 (**1**), FUB-PB-22, AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB, AM-2201 indazole analog (THJ-2201), NNEI indazole analog (MN-18), 4-methylbuphedrone, DL-4662, and 3,4-EDMA were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA); 2-methylpropyl *N*-(naphthalen-1-yl) carbamate (**5**) and diphenidine from Otava Ltd. (Toronto, Canada) and Tocris Bioscience (Bristol, UK), respectively. All other common chemicals and solvents were of analytical reagent grade or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. As solvents for nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, chloroform- d_3 (99.96%), methanol- d_4 (99.96%), methanol- d_3 (99%), pyridine- d_5 (99.96%), and dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 (99.96%) were purchased from the

ISOTEC division of Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Preparation of sample solutions

For the qualitative analyses, 10 mg of each herbal-type product was crushed into powder and extracted with 1 ml of methanol under ultrasonication for 10 min. A 2-mg portion of each powder-type product was extracted with 1 ml of methanol under ultrasonication for 10 min. After centrifugation (3,000 rpm, 5 min) of each extract, the supernatant solution was passed through a centrifugal filter (Ultrafree-MC, 0.45- μ m filter unit; Millipore, Bedford, MA, USA) to serve as the sample solution for the analyses. If necessary, the solution was diluted with methanol to a suitable concentration before instrumental analyses.

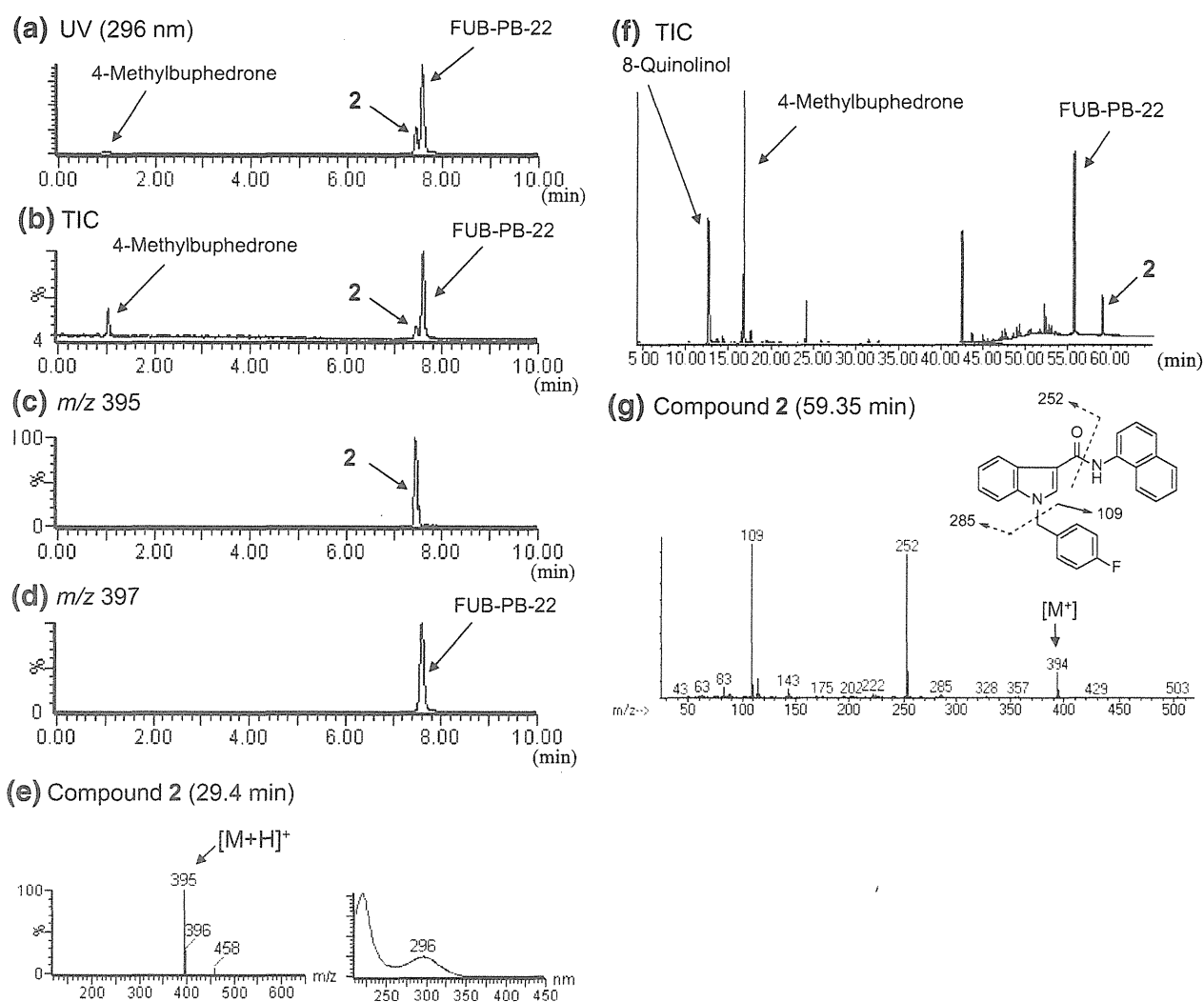


Fig. 3 LC-MS and GC-MS analyses of product B. LC-UV-PDA chromatogram (a), TIC (b), extracted-ion chromatograms at m/z 395 (c) and 397 (d), and ESI mass and UV spectra of peak 2 (e) are

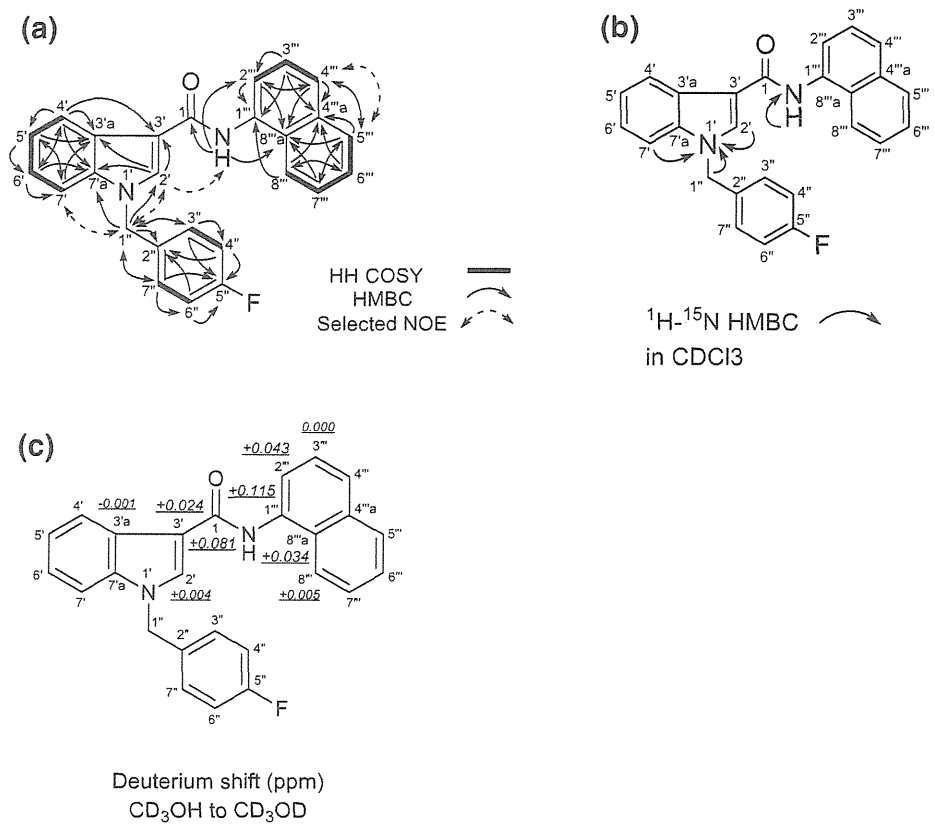
shown. TIC (f) and EI mass spectrum of peak 2 (g) obtained by GC-MS are also presented

Analytical conditions

Each sample solution was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS) and by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in the electron ionization (EI) mode according to our previous report [11]. Two elution programs were used in the LC-MS analysis. Each analysis was carried out with a binary mobile phase consisting of solvent A (0.1 % formic acid in water) and solvent B (0.1 % formic acid in acetonitrile). The elution program (1) used for analysis of cannabinoids was as follows: 35 % B (4-min hold), 65 % B to 75 % B (4–16 min), and up to 90 % B (16–17 min, 6-min hold) at a flow rate of 0.3 ml/

min. The elution program (2) used for the analysis of cathinone derivatives and other compounds was as follows: 5 % B to 20 % B (0–20 min), and up to 80 % B (20–30 min, 10-min hold). In this study, products A, B, and D were analyzed using program (1), and products C and E analyzed using program (2). GC-EI-MS was performed on an Agilent 6890N GC with a 5975 mass selective detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a capillary column (HP-1MS capillary, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25- μ m film thickness; Agilent Technologies) with helium gas as a carrier at 0.7 ml/min. The conditions were: electron energy, 70 eV; injector temperature, 220 $^{\circ}$ C; injection, splitless mode for 1.0 min; oven temperature program, 80 $^{\circ}$ C (1-min hold) and increase at a rate of

Fig. 4 Results of HH correlation spectroscopy (HH COSY), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), selected nuclear Overhauser effect (NOE) correlations (a), ^1H - ^{15}N HMBC correlations (b) and deuterium-induced isotope shift of NH protons for the ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) signals of compound **2** (FDU-NNEI) in CD_3OD (c)



5 °C/min to 190 °C (15-min hold) followed by increase at 10 °C/min up to 310 °C (15-min hold); transfer line temperature, 280 °C; scan range, m/z 40–550.

The obtained GC mass spectra were compared to those of an EI-MS library (Mass Spectra of Designer Drugs 2013; WILEY-VCH, Weinheim, Germany). We also used our in-house EI-MS library of designer drugs obtained by our ongoing survey of illegal products and commercially available reagents for the structural elucidation.

We measured the accurate mass numbers of the target compounds by liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight–mass spectrometry (LC–QTOF–MS) in the ESI mode according to our previous report [12].

For the isolation of each compound, we performed two preparative methods. One was recycling preparative HPLC on a JAI (Japan Analytical Industry, Tokyo, Japan) LC-9201 instrument with gel permeation JAIGEL-1H columns (JAI) and chloroform as an eluent. The other was silica gel or ODS column chromatography (CC) on a Biotage (Stockholm, Sweden) Isorela One instrument with a SNAP KP-sil column (particle size: 50 μm), SNAP Ultra column (particle size: 25 μm), or SNAP KP-C18-HS column (particle size: 50 μm) (Biotage).

The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on ECA-800 and 600 spectrometers (JEOL, Tokyo, Japan). Assignments were made via ^1H NMR, ^{13}C NMR, heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), ^{15}N HMBC, HH correlation spectroscopy (HH COSY), nuclear Overhauser effect (NOE), and incredible natural abundance double-quantum transfer experiment (INADEQUATE) spectra.

Isolation of compound **2**

A 3.0-g sample of mixed dried plants (product B) was extracted with 250 ml of chloroform by ultrasonication for 30 min. The extraction was repeated three times, and the supernatant fractions were combined and evaporated to dryness. The extract was separated by silica gel CC (SNAP KP-sil, 25 g; Biotage) [hexane/ethyl acetate (100:0–75:25)] and ODS CC (SNAP KP-C18-HS, 12 g; Biotage) [water/methanol (30:70–0:100)]. The extract was then recrystallized in ethyl acetate/hexane, which gave compound **2** (28 mg) as a pale yellow solid.

Isolation of compound 3

A 2.8-g sample of mixed dried plants (product C) was extracted by the same method as that used for compound 2. The separation of extract by silica gel CC (SNAP KP-sil, 50 g; Biotage) [hexane/ethyl acetate (50:50)] and ODS CC (SNAP KP-C18-HS, 12 g; Biotage) [water/methanol (35:65)] resulted in the isolation of compound 3 (8 mg) as a white solid.

Isolation of compounds 4 and 6

A 5.6-g sample of mixed dried plants (product D) was extracted by the same method described above. Separation of extract by silica gel CC (SNAP Ultra, 25 g; Biotage) [hexane/ethyl acetate (87:13–0:100)] gave fractions 1 and 2. Fraction 1 was further separated by silica gel CC (SNAP KP-sil, 50 g; Biotage) [hexane/ethyl acetate (90:10)] to obtain compound 4 (5 mg) as a white solid. Fraction 2 was dissolved in chloroform and purified by recycling preparative HPLC (eluent: chloroform) to give compound 6 (1 mg) as a white solid.

Isolation of compounds 7 and 8

A 600-mg sample of powder (product E) was dissolved in 2.5 % triethylamine (TEA) in hexane/ethyl acetate (50:50) and then loaded onto a silica gel CC (SNAP KP-sil, 50 g; Biotage), which was then eluted with a stepwise gradient of 2.5 % TEA in hexane/2.5 % TEA in ethyl acetate (90:10–0:100) to give compound 7 (73 mg) and compound 8 (302 mg) as a colorless oil, respectively.

Results and discussion

Identification of an unknown peak 1

An unknown peak 1 was detected with an NMDA receptor channel blocker, diphenidine (Fig. 1b) [13] in the LC–MS and GC–MS for product A (Fig. 2a, b, e). Based on the LC–MS and GC–MS data, peak 1 was finally identified as a synthetic cannabinoid FDU-PB-22 (Figs. 1a, 2c, f) by direct comparison of the data to those of the purchased authentic compound (Fig. 2d, g). Compound 1 was thus detected as a newly distributed NPS in Japan. In addition, FDU-PB-22 (1) has been controlled as a designated substance (Shitei-Yakubutsu) in Japan since August 2014.

Identification of an unknown peak 2

In the LC–MS and GC–MS analyses, an unknown peak 2 was detected with a synthetic cannabinoid (FUB-PB-22),

Table 1 NMR data of compound 2

No.	¹³ C	¹ H
1	167.5	–
2'	133.0	8.25, 1H, brs
3'	111.5	–
3'a	128.6	–
4'	122.7	8.22, 1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz
5'	122.7	7.20, 1H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz
6'	124.0	7.24, 1H, t, <i>J</i> = 7.8 Hz
7'	111.6	7.45, 1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz
7'a	138.2	–
1''	50.7	5.48, 2H, s
2''	134.5, d, <i>J</i> = 2.8 Hz	–
3''/7''	130.3, d, <i>J</i> = 7.7 Hz	7.30 and 7.29, each 1H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz, overlapped
4''/6''	116.6, d, <i>J</i> = 22.2 Hz	7.08 and 7.07, each 1H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz, overlapped
5''	163.8, d, <i>J</i> = 244.7 Hz	–
1'''	134.9	–
2'''	125.2	7.61, 1H, d, <i>J</i> = 6.9 Hz
3'''	126.6	7.53, 1H, m, overlapped
4'''	127.8	7.82, 1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz
4'''a	135.9	–
5'''	129.3	7.91, 1H, m
6'''	127.1	7.51, 1H, m, overlapped
7'''	127.2	7.51, 1H, m, overlapped
8'''	124.1	8.06, 1H, m
8'''a	131.3	–
NH	–	9.96, 1H, s

Recorded in CD₃OH at 800 MHz (¹H) and 200 MHz (¹³C), respectively; data in δ ppm (*J* in Hz)

its synthetic component 8-quinolinol, and a cathinone derivative (4-methylbuphedrone) in product B (Figs. 1b, 3a, b, d, f). By GC–MS analysis, peak 2 showed a molecular ion at *m/z* 394 (Fig. 3g). The major fragment ions of peak 2 (*m/z* 109 and 252) are the same as those of FDU-PB-22 (1) except for the molecular ion of compound 1 at *m/z* 395 (Fig. 2g). In the LC–MS analysis, peak 2 showed the protonated molecular ion at *m/z* 395 ([M + H]⁺) (Fig. 3c, e). However, the major fragment ion at *m/z* 252 of FDU-PB-22 (1) given by cleavage of an ester group (Fig. 2d) was not observed in the mass spectrum of peak 2 (Fig. 3e). The accurate mass spectrum obtained by LC–QTOF–MS gave an ion peak at *m/z* 395.1565, suggesting that the protonated molecular formula of compound 2 was C₂₆H₂₀N₂O_F (calcd. 395.1560).

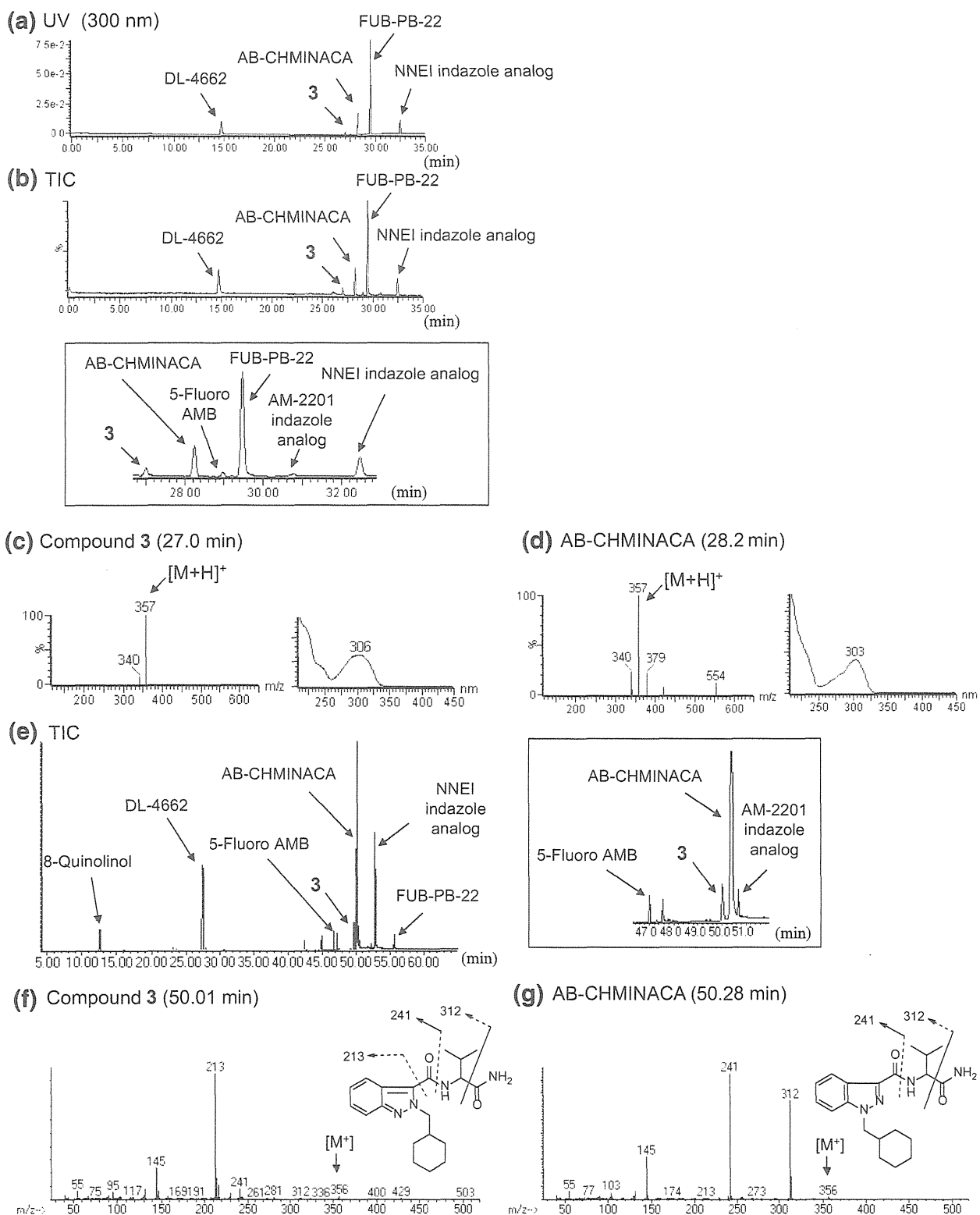


Fig. 5 LC-MS and GC-MS analyses of product C. The LC-UV-PDA chromatogram (a), TIC (b), and ESI mass and UV spectra of peak 3 (c) and the authentic AB-CHMINACA (d) are shown. TIC (e),

and EI mass spectra of peaks 3 (f) and the authentic AB-CHMINACA (g) obtained by the GC-MS analysis are also shown

The structure of compound **2** was elucidated by NMR analysis (Fig. 4; Table 1). The analyses by ^1H and ^{13}C NMR, HH COSY, HMQC, HMBC, ^{15}N HMBC and 1D-NOE spectra of compound **2** revealed the presence of a 1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indole (positions 1' to 7'a and positions 1'' to 7'') and a *N*-(naphthalen-1-yl)-carboxamide moieties (position 1 and positions 1''' to 8'''a) as shown in Fig. 4a, b. However, no HBMC correlation between the two moieties was observed. We, therefore, measured the deuterium isotope effect on the NH amide proton on the ^{13}C chemical shift to determine the connection between the two moieties.

We compared the ^{13}C NMR spectrum of compound **2**, measured in CD_3OH , with that in CD_3OD . The isotope shift values for the ^{13}C NMR signals of this compound are shown in Fig. 4c. The first- to fourth-largest deuterium shifts (0.115, 0.081, 0.043, 0.034 ppm) were observed at the positions of C-1''', C-1, C-2''', and C-8'''a of the *N*-(naphthalen-1-yl)carboxamide moiety. The fifth-largest deuterium shift of 0.024 ppm was attributed to the three-bond deuterium isotope effect of the NH amide proton on the indole carbon (C-3'). These results strongly suggested that the 1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indole moiety is connected at the 3'-position of the indole to the carboxamide (1-CONH).

On the basis of the above data, compound **2** was finally identified as 1-(4-fluorobenzyl)-*N*-(naphthalen-1-yl)-1*H*-indole-3-carboxamide (Fig. 1a). Compound **2** is a novel compound, and therefore, we named it FDU-NNEI because the structure of compound **2** consists of a [1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indolyl]carbonyl moiety and a (naphthalen-1-yl)amino moiety, which are characteristic parts of two synthetic cannabinoids, FDU-PB-22 (**1**) and NNEI, respectively (Fig. 1a–c) [10].

Identification of an unknown peak **3**

We detected an unknown peak **3** together with seven peaks of five known synthetic cannabinoids (AB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB, FUB-PB-22, AM-2201 indazole analog and NNEI indazole analog), a known cathinone derivative DL-4662, and 8-quinolinol in the LC–MS and GC–MS chromatograms for product C (Fig. 5a, b, e). In the LC–MS and GC–MS analysis, the unknown peak **3** showed a protonated molecular ion signal at m/z 357 [$\text{M} + \text{H}^+$] (Fig. 5c) and a molecular ion signal at m/z 356 [M^+] (Fig. 5f). The accurate mass spectrum obtained by LC–QTOF–MS gave an ion signal at m/z 357.2282, suggesting that the protonated molecular formula of compound **3** was $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2$ (calcd. 357.2291). The presumed molecular formula of compound **3** ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$: 356) was thus the same as that of AB-CHMINACA (Fig. 1b). However, the LC–MS and GC–MS spectra patterns, in addition to each retention time, were different (Fig. 5c, d, f, g).

Table 2 NMR data of compound **3** and AB-CHMINACA

No.	AB-CHMINACA	Compound 3	
	^{13}C	^{13}C	^1H
1	172.6	172.6	–
2	56.7	58.4	4.38, 1H, dd, $J = 8.7, 6.9$ Hz
3	31.2	30.1	2.15, 1H, m
4	19.3	19.3	0.99, 3H, d, $J = 6.4$ Hz, overlapped
5	17.9	18.2	0.96, 3H, d, $J = 6.9$ Hz, overlapped
1'	–	–	–
2'	–	–	–
3'	136.4	129.1	–
3'a	121.8	120.3	–
4'	121.6	120.2	7.81, 1H, d, $J = 8.3$ Hz
5'	122.4	122.7	7.20, 1H, t, $J = 7.3$ Hz
6'	126.6	125.7	7.31, 1H, t, $J = 7.3$ Hz
7'	110.6	117.4	7.68, 1H, d, $J = 8.7$ Hz
7'a	141.2	146.4	–
1''	54.5	57.3	4.58 and 4.49, each 1H, dd, $J = 12.8, 7.3$ Hz
2''	38.3	38.9	1.90, 1H, m
3''	30.0	30.0	0.97, 2H, m, overlapped
4''	25.0	25.1	1.11, 2H, m, overlapped
5''	25.7	25.7	1.56, 1H, m
			1.09, 1H, m, overlapped
6''	25.1	25.1	1.61, 2H, m
7''	29.9	29.9	1.47, 2H, d, $J = 12.4$ Hz
1'''-CONH	161.3	159.8	8.38, 1H, d, $J = 8.7$ Hz
1-NH ₂	–	–	7.54 and 7.16, each 1H, brs

Recorded in $\text{DMSO}-d_6$ at 800 MHz (^1H) and 200 MHz (^{13}C), respectively; data in δ ppm (J in Hz)

The observed ^1H and ^{13}C NMR spectra (Table 2), HH COSY, HMQC, HMBC and ^{15}N HMBC correlations for compound **3** indicated the presence of *N*-cyclohexylmethyl-indazole and *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-carboxamide moieties (Fig. 6a, b). Additionally, 2D-INADEQUATE correlation revealed that the cyclohexylmethyl-indazole moiety is connected at the 3'-position of the indazole to the carboxamide (C-1'''). Nevertheless, the ^{13}C NMR chemical shifts of compound **3** were significantly different at the C-3' (δ_{C} 129.1), C-7' (δ_{C} 117.4) and C-7'a (δ_{C} 146.4) positions from those of AB-CHMINACA [C-3' (δ_{C} 136.4), C-7' (δ_{C} 110.6) and C-7'a (δ_{C} 141.2) as shown in Table 2.

We next compared the ^{15}N NMR chemical shifts of compound **3** with those of 1*H*-indazole derivatives (Table 3). The ^{15}N chemical shifts at the *N*-1' (δ_{N} –85.5) and *N*-2' (δ_{N} –153.9) of the indazole moiety in compound