

201451031A

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費

(医薬品等規制調和・評価研究事業)

(H26-医薬 B-一般-031)

危険ドラッグを中心とした中枢神経系に作用
する物質の迅速検出法の開発に関する研究

委託業務成果報告書

平成 27 年 3 月

業務主任者：船田正彦

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費

(医薬品等規制調和・評価研究事業)

(H26-医薬 B-一般-031)

危険ドラッグを中心とした中枢神経系に作用
する物質の迅速検出法の開発に関する研究

委託業務成果報告書

平成 27 年 3 月

業務主任者：船田正彦

本報告書は、厚生労働省の平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）による委託業務として、独立法人 国立精神・神経医療研究センター（研究代表者：船田正彦）が実施した平成 26 年度「危険ドラッグを中心とした中枢神経系に作用する物質の迅速検出法の開発に関する研究（H26-医薬 B-一般-031）」の成果を取りまとめたものである。

目 次

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
（H26-医薬 B-一般-031）

委託業務成果報告書（総括）

危険ドラッグを中心とした中枢神経系に作用する物質の 迅速検出法の開発に関する研究

I. 平成 26 年度 委託業務成果報告書（総括）		
船田正彦（国立精神・神経医療研究センター）	-----	1
II. 平成 26 年度 委託業務成果報告書（業務項目）		
研究-1：合成カンナビノイド迅速検査法の開発：危険ドラッグ製品からの検出 船田正彦（国立精神・神経医療研究センター）	-----	7
研究-2：新規流通危険ドラッグの危険性評価法の検討 花尻（木倉）瑠理（国立医薬品食品衛生研究所）	-----	12
研究-3：危険ドラッグに含まれる薬物成分の機器分析 鈴木 仁（東京都健康安全研究センター）	-----	32
研究-4：北海道内の危険ドラッグ機器分析 佐藤正幸（北海道立衛生研究所）	-----	39
研究-5：県内試買危険ドラッグの成分解析 宮澤真紀（神奈川県衛生研究所）	-----	80
研究-6：危険ドラッグの機器分析 棚橋高志（愛知県衛生研究所）	-----	91
研究-7：危険ドラッグの機器分析 沢辺善之（大阪府立公衆衛生研究所）	-----	97
研究-8：香川県における危険ドラッグの検出状況について 氏家あけみ（香川県環境保健研究センター）	-----	103
研究-9：福岡県内に流通する危険ドラッグの実態調査 梶原淳睦（福岡県保健環境研究所）	-----	113
III. 学会等発表実績	-----	117

委託業務成果報告書（総括）

危険ドラッグを中心とした中枢神経系に作用する物質の
迅速検出法の開発に関する研究

業務主任者 船田正彦

（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部 依存性薬物研究室長）

【研究要旨】

危険ドラッグの蔓延は大きな社会問題となっている。危険ドラッグの検出・同定に機器分析が必須であり、検査体制に関する現状把握が重要となっている。本研究では、全国 8 か所の衛生研究所の協力を得て、危険ドラッグの流通状況および機器分析による解析状況を調べた。また、取締りや救急医療の現場では「危険ドラッグ」の簡易検出手法の導入が望まれる。そこで、合成カンナビノイドの検出のために、樹立細胞を利用した検出手法に関する研究を行い、機器分析の検出データとの関連性について比較検討した。

研究 1： 地方衛生研究所より提供を受けた乾燥植物片製品について、CB₁ 受容体発現安定細胞による合成カンナビノイドの検出感度に関する検討を行った。35 製品解析を実施し 30 製品からは合成カンナビノイド含有のシグナルが検出された。一方、5 製品からはシグナルが検出されなかった。機器分析との一致率は 100%であり、CB₁ 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度は極めて高いことが示された。

研究 2： セロトニン 5-HT_{2A} 受容体-エクオリン共発現細胞株および 5-HT_{2A} 受容体-Gq/11 経路の活性化状態を NFAT-luciferase レポーター遺伝子によりモニターするアッセイ系を利用して、セロトニン受容体作用薬の検出感度を検討した。双方、同様の結果が得られ、特に NFAT-luciferase レポーターアッセイ系はコスト面、応用面で優れた手法であると考えられる。また、セロトニン受容体作用薬の評価には行動量解析のような、*in vivo* における簡便な薬理作用の評価法検討も重要であると考えられる。また、オピオイド μ -受容体について安定発現細胞に着手した。

研究 3： 201 製品のうち 148 製品から総計で 42 種の薬物が検出され、そのうち麻薬は 2 種、薬事法指定薬物は 4 種、新たに検出された薬物（新規薬物）は 29 種（カチノン系化合物 15 種、合成カンナビノイド 9 種、フェネチルアミン誘導体 3 種、その他 2 種）であった。

研究 4： 北海道内で入手した 7 製品については全てから合成カンナビノイドが検出された。

研究 5： 危険ドラッグ 20 製品から、カチノン系化合物及びフェネチルアミン系化合物が検出された。一方、合成カンナビノイドは検出されなかった。

研究 6： 県内の販売店にて 71 製品を試買し、含有成分を分析したところ、69 製品から指定薬物が検出された。検出された指定薬物は、合成カンナビノイド（4 種類）、カチノン系化合物（1 種）、その他（3 種）であった。2 種類以上の成分が検出された製品は 30 製品あり、うち 3 製品からは 3 種類の成分が検出された。粉末製品は成分濃度（%）が高く、特に Diphenidine 含有製品は 3 製品で平均 93.8%あった。

研究 7：17 製品（植物片（いわゆるハーブ）8 製品、粉末 6 製品、液体 3 製品）を解析し、検出した物質は、合成カンナビノイド（植物片 7 製品）、カチノン系化合物（粉末 5 製品、液体 3 製品、植物片 1 製品）、フェネチルアミン系等であった。検出薬物数は 1～2 物質の製品が大半であった。

研究 8：香川県内店舗で買い上げた危険ドラッグ（植物片）15 製品について解析した。合成カンナビノイド（8 種類）が検出された。

研究 9：平成 26 年度に分析を行った 41 製品全てから指定薬物成分または指定薬物構造類似成分が検出された。製品を買い上げた時点で既に指定薬物に指定されていた成分は 2 成分あった。また、買い上げ時点での指定薬物構造類似成分は 12 成分検出され、その後指定薬物に指定された成分が 11 成分であった。最も多く検出された成分はカチノン系化合物の α -PHP で 17 製品から検出された。次に多く検出されたのは Diphenidine で 12 製品から検出された。

本研究では、全国 8 か所の衛生研究所の危険ドラッグ解析結果から、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物の流通が全国的規模で拡大していることが確認された。また、地方による偏りも確認され、危険ドラッグ製品は複数の製造元が存在することも確認された。一方、製品によっては、タイプの異なる危険ドラッグが複数混在する場合も多く、製品の形状から有害作用を推測することは困難であった。また、幻覚作用を示す薬物の混入も確認されており、依然として危険性の高い製品が流通していることが確認された。

検出法開発の一環として、CB₁ 受容体、5-HT_{2A} 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度について検討した。合成カンナビノイドおよびセロトニン系危険ドラッグの検出に応用可能であることが示唆された。蛍光や発光システムを利用して、危険ドラッグ（受容体作用薬）の作用強度を解析する評価システムは、危険ドラッグの中樞作用および有害作用発現の迅速かつ高感度な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。

分担研究者：船田正彦
（国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 薬物依存研究部）

分担研究者：花尻（木倉）瑠理
（国立医薬品食品衛生研究所 生薬部）

分担研究者：鈴木 仁
（東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 医薬品研究科）

分担研究者：佐藤正幸
（北海道立衛生研究所 理化学部）

分担研究者：宮澤真紀
（神奈川県衛生研究所 理化学部）

分担研究者：棚橋高志
（愛知県衛生研究所 衛生化学部）

分担研究者：沢辺善之
（大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部薬事指導課）

分担研究者：氏家あけみ
（香川県環境保健研究センター 保健科学部門）

分担研究者：梶原淳睦
（福岡県保健環境研究所 生活化学課）

目 的

危険ドラッグの蔓延が大きな社会問題となっている。代表的な製品の形状として、危険ドラッグ（粉末）、液状、植物片の 3 製品が流

通している。こうした、製品に含まれる危険ドラッグの検出・同定には機器分析が必須であり、検査体制に関する現状把握が重要となっている。

本研究では、危険ドラッグ流通・検出に関する基本情報把握のために、全国8か所の衛生研究所の協力を得て、危険ドラッグの流通状況および機器分析による解析状況を調べた。また、取締りや救急医療の現場では「危険ドラッグ」の簡易検出手法の導入が望まれる。そこで、合成カンナビノイドの検出のために、樹立細胞を利用した検出手法に関する研究を行い、機器分析の検出データとの関連性について比較検討した。

方法および結果

研究1：地方衛生研究所より提供を受けた乾燥植物片製品について、CB₁受容体発現安定細胞による合成カンナビノイドの検出感度に関する検討を行った。Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にヒト CB₁受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-CB₁細胞を確立した。この細胞を使用して、細胞内 Ca²⁺を測定した。乾燥植物片形状の35製品より、含有成分を抽出し、解析を実施し30製品の添加により、細胞内 Ca²⁺が増加した。一方、5製品においては、有意な反応は確認されなかった。

研究2：GPCRsが関与するセロトニン受容体及びオピオイド受容体に作用する危険ドラッグに着目し、以下の4課題を検討した。

1. 市販のセロトニン 5-HT_{2A} 受容体とエクオリンを安定に共発現する組換え細胞株を用いて、活性既知の麻薬 DOI と新規流通活性未知危険ドラッグ成分4化合物のセロトニン受容体活性を評価した。その結果、ほぼ活性の見られなかった 2-Methoxy-4,5-methylenedioxymethcathinone を除き、いずれも用量依存的に 5-HT_{2A} 受容体の活性化が認められ、DOI >> Allylexcaline > 3C-E > bk-2C-B であった。

本アッセイに使用した細胞株は増殖機能を失った使い切りタイプのものであるが、細胞培養を必要とせず、直ちに発光基質の取り込みを行い、即日に活性評価を行うことが可能であった。細胞培養施設を持たない機関であっても、発光を検出する装置があれば活性の検出が可能であり、コスト面で問題はあるが、汎用性に優れていた。

2. 5-HT_{2A} 受容体-Gq/11 経路の活性化状態を NFAT-luciferase レポーター遺伝子によりモニターするアッセイ系を構築し、活性既知の麻薬 DOI と新規流通活性未知危険ドラッグ成分7化合物のセロトニン受容体活性を評価した。その結果、陽性コントロールの Serotonin に対し、既報よりも高感度なアッセイ系が確立できた。また、ほぼ活性の見られなかった N-OH-3,4-EDMA を除いて、その他化合物では用量依存的に 5-HT_{2A} 受容体の活性化が認められ、25D-NBOMe > DOI >> 4-OH MET > Allylexcaline > 3C-E >> bk-2C-B > 3,4-EDMA であった。さらに、DOI、Allylexcaline 及び 3C-E の活性値は、別途市販のアッセイ系で検討した値とほぼ同等の結果が得られた。コスト面、応用面で優れたアッセイ手法であると考えられる。

3. マウスに活性既知の麻薬 DMT 及び新規流通活性未知危険ドラッグ成分7化合物を投与し、自発運動量に及ぼす作用を調べた。同じセロトニン受容体アゴニストであっても、構造の違いにより作用に差が認められ、in vitro アッセイでは評価できない結果も得られた。行動量解析のような、in vivo における簡便な薬理作用の評価法検討も重要であると考えられる。

4. ヒト μ -オピオイド受容体 (MOR) に対してアンタゴニスト作用を有する危険ドラッグ成分を包括的にスクリーニングするための in vitro 評価系の構築を目的として、ヒト MOR の主要な Splice Variant である MOR-1 (OPRM1) の安定発現細胞作成を検討した。細胞内 cAMP 量を指標とするアゴニスト活性評価系の開発を進める予定である。

今後、各手法の頑健性を検討すると共に、化合物数を増やしてデータを蓄積し、in vitro と in vivo アッセイの相関性についても調査し、各手法の信頼性を高めていく必要があると考えられる

研究 3：薬物の分析は、主にフォトダイオードアレイ検出器付液体クロマトグラフィー (LC/PDA)、電子イオン化質量分析計付ガスクロマトグラフィー (GC/EI-MS) を用い、必要に応じて高分解能質量分析法 (TOF/MS) 及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定法にて構造解析を行った。調査が終了した 201 製品のうち 148 製品から総計で 42 種の薬物が検出され、そのうち麻薬は 2 種、薬事法指定薬物は 4 種、新たに検出された薬物 (新規薬物) は 29 種であった。新規検出薬物 29 種の内訳は、フェネチルアミン誘導体 3 種 (25D-NBOMe、25B-NBF、25C-NBF)、カチノン誘導体 15 種 (α -PNP、4F-IPV、4F- α -PVP、ピペリジンアナログ、4F-オクテドロン、4-フルオロ- α -POP、4-MeO- α -PBP、DL-4662、3,4-ジメトキシ- α -PHP、5-PPDI、bk-IVP、5-BPDI、5-DBFPV、N,N-ジメチルペンチロン、3,4-メチレンジオキシ- α -PHP、 α -PBT)、合成カンナビノイド 9 種 (NM2201、FDU-PB-22、5F-NPB-22、PX-1、5-Fluoro-AMB、5F-ADB、5F-ADB-PINACA、AB-CHMINACA、ADB-CHMINACA)、その他 2 種 (2-MeO-ジフェニジン、アセチルフエンタニル) であった。

研究 4：北海道内の店舗又はインターネットから買い上げた危険ドラッグ製品に配合されている指定薬物や指定薬物類似体をガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS)、フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-PDA) 及び液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) により分析した。更に、業務主任者よりご供与いただいた製品についても分析した。その結果、北海道内で入手した 7 検体については全てから合成カンナビノイド、東京都内で入手した 10 検体につい

ては、3 検体から合成カンナビノイド、別の 3 検体からカチノン系化合物、1 検体からフェネチルアミン系化合物、4 検体からその他の化合物が検出された。

研究 5：神奈川県内で試買された危険ドラッグ 20 製品について、PDA 検出器付き超高速液体クロマトグラフ (UPLC-PDA)、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) 及び液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) を用いて分析を実施した。分析対象とした製品形態は植物片 (いわゆるハーブ状)、粉末及び液体であり、植物片が半数を占めている。しかしながら、検出された薬物はカチノン系及びフェネチルアミン系と推定され、主要な薬物として合成カンナビノイド系は不検出であった。また、上記の分析手法では薬物が検出されない一部の粉末製品及び植物片製品中の白色物質について、赤外吸収スペクトルを測定した結果、薬物とは異なる成分が確認された。

研究 6：平成 26 年 7~9 月に愛知県内の販売店舗で 71 製品を試買し、含有成分を分析したところ、69 製品から指定薬物が検出された。検出された指定薬物は 8 種類で、合成カンナビノイドが AB- CHIMINACA、NM2201、FDU-PB-22、5-fluoro ADB の 4 成分、カチノン誘導体が PV9 の 1 成分、その他 Diphenidine、3-MeO PCP、Methoxphenidine の 3 成分だった。このうち、試買時に指定薬物として規制されていたのは PV9 のみであった。検出製品数が多かったのは、AB- CHIMINACA の 36 製品、Diphenidine の 34 製品、NM2201 15 製品の順であった。2 種類以上の成分が検出された製品は 30 製品あり、うち 3 製品からは 3 種類の成分が検出された。検出した成分について濃度 (%) を求めたところ、1 成分につき 1 製品あたり平均 9.4% であった。検出成分別では、検出製品数が最も多かった AB- CHIMINACA が平均 0.6% で、その他 NM2201 が 13.4%、FDU-PB-22 が 4.6%、PV9 が 0.07%、Diphenidine が 18.2% であり、成分によりばら

つきがあった。粉末製品は成分濃度（％）が高く、特に Diphenidine 含有製品は 3 製品で平均 93.8％あった。

研究 7：平成 26 年度、大阪府内の店舗及びインターネットでの買い上げを実施した製品のうち、17 製品について解析した。製品の形状は、植物片（いわゆるハーブ）8 製品、粉末 6 製品、液体 3 製品であった。検出した物質は、合成カンナビノイド、カチノン系、フェネチルアミン系等であった。検出薬物数は 1～2 物質の製品が大半であった。すべての製品から指定薬物が検出されたが、製品の買い上げ以降に指定された指定薬物であった。

研究 8：香川県内の店舗より買い上げた危険ドラッグ 15 検体について、GC/MS、LC/MS/MS、LC-PDA により得られるマススペクトル、クロマトグラム等のデータにより含有成分を推定し、標準品のあるものについては、同定及び定量を実施した。その結果 15 検体全てから合成カンナビノイド系の指定薬物成分（現在は麻薬に指定されたもの含む）が検出された。複数種の化合物を含有しているものが多く、数十 mg/g から数百 mg/g が添加されていた。

研究 9：危険ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）として、大麻や覚せい剤などの類似構造を有する薬物の流通とその乱用が社会問題となっている。本研究では、市場に流通する製品の実態調査を目的に、福岡県内にて販売されていた危険ドラッグ製品について成分の同定、定量を行った。その結果、平成 26 年度は 41 製品のうち 2 製品からそれぞれ異なる 2 成分の指定薬物と全ての製品から指定薬物類似成分が検出された。検出された指定薬物類似成分は 12 成分であった。また、危険ドラッグ製品から構造解析や動物試験等に供する試料を作成するため精製法を検討した。

本研究では、全国 8 か所の衛生研究所の危険ドラッグ解析結果から、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物の流通が全国的規模で拡大していることが確認された。また、地方による偏りも確認され、危険ドラッグ製品は複数の製造元が存在することも確認された。一方、製品によっては、タイプの異なる危険ドラッグが複数混在する場合も多く、製品の形状から有害作用を推測することは困難であった。また、幻覚作用を示す薬物の混入も確認されており、依然として危険性の高い製品が流通していることが確認された。

検出法開発の一環として、CB₁ 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度について検討した。細胞による解析結果と機器分析結果との一致率は 100％であり、CB₁ 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度は極めて高いことが示された。検出法開発の一環として、CB₁ 受容体、5-HT_{2A} 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度について検討した。合成カンナビノイドおよびセロトニン系危険ドラッグの検出に応用可能であることが示唆された。蛍光や発光システムを利用して、危険ドラッグ（受容体作用薬）の作用強度を解析する評価システムは、危険ドラッグの中樞作用および有害作用発現の迅速かつ高感度な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。植物系危険ドラッグ（いわゆる脱法ハーブ）を筆頭に、危険ドラッグの乱用拡大は依然として深刻な状況であり、乱用防止のため一層の啓発が必要であろう。

健康危険情報

本研究は、危険ドラッグの製品からの検出および細胞による検出に関する研究であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

結 論

研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima J., Takahashi M., Uemura N., Seto T., Fukaya H., Suzuki J., Yoshida M., Kusano M., Nakayama H., Zaito K., Ishi A., Moriyasu T., Nakae D. : Identification of N,N-bis(1-pentylindol-3-ylcarboxy)naphtylamine (BIPICANA) found in an herbal blend product in the Tokyo metropolitan area and its cannabimimetic effects evaluated by in vitro [³⁵S]GTPγS binding assays. Forensic Toxicol. 33: 84-92. 2015.

2. 学会発表

- 1) 船田正彦：危険ドラッグの薬物依存性と細胞毒性. 日本薬学会第 135 年会. 神戸. 3 月 28 日. 2015.
- 2) 鈴木仁, 小縣昭夫, 不破達, 藤谷知子, 牛山慶子, 中嶋順一, 田中豊人, 小野恭司, 久保喜一, 吉田正雄, 市川瑠子, 高橋美佐子, 植村望美, 清水聖子, 長嶋眞知子, 清水雅子, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: 麻薬 α-PVP 誘導体等の測定結果及びその生体影響試験. 日本薬学会第 135 年会. 神戸. 3 月 28 日. 2015.
- 3) 安藤麗香, 大野春香, 棚橋高志, 上野英二, 猪飼誉友, 皆川洋子: 愛知県における危険ドラッグ製品の検査状況について. 日本薬学会第 135 年会. 神戸. 3 月 28 日. 2015.
- 4)

知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし

委託業務成果報告（分担）

合成カンナビノイド迅速検査法の開発：危険ドラッグ製品からの検出

分担研究者：船田正彦（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

危険ドラッグの流通拡大は深刻である。危険ドラッグに含まれる化学物質としては、合成カンナビノイドが主流である。現在、特定の化学物質が規制されるとその類似構造を有する別の化学物質が登場する悪循環が続いている。本研究では、カンナビノイド CB₁ 受容体に着目し、CB₁ 受容体発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞による検出妥当性を検証した。

地方衛生研究所より提供を受けた乾燥植物片製品について、CB₁ 受容体発現安定細胞による合成カンナビノイドの検出感度に関する検討を行った。35 製品解析を実施し 30 製品からは合成カンナビノイド含有のシグナルが検出された。一方、5 製品からはシグナルが検出されなかった。機器分析との一致率は 100%であり、CB₁ 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度は極めて高いことが示された。

CHO-CB₁ 細胞を利用した評価は、合成カンナビノイドの構造に関わり無く、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用である。カンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用強度を解析する評価システムは、危険ドラッグの中枢作用および有害作用発現の迅速かつ高感度な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。

A. 研究目的

危険ドラッグの乱用による重篤な健康被害が発生し、大きな社会問題となっている。

危険ドラッグ製品からは、5-(1,1-dimethylheptyl)-2-(3-hydroxy-cyclohexyl)-phenol (CP-47,497) およびその側鎖の炭素数が異なる 5-(1,1-dimethyloctyl)-2-(3-hydroxycyclohexyl)-phenol (CP-47,497-C8)、1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole (JWH-018) などの合成カンナビノイドが検出されている¹⁾。

流通が確認されている合成カンナビノイドは、大麻の主要な精神活性成分である Δ⁹-tetrahydrocannabinol (Δ⁹-THC) の作用点であるカンナビノイド受容体への結合能を有するため、類似の中枢作用が発現すると考えられ

ている^{2,3)}。特に、脳内 CB₁ 受容体は、中枢作用および薬物依存形成において重要であることが報告されている^{4,5)}。簡易検出方法を用いた危険性を推測するスクリーニング法の確立のために、CB₁ 受容体に対する作用を指標にした解析が重要であると考えられる。

本研究では、チャイニーズハムスター卵巣細胞：Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞を確立し、危険ドラッグ製品に含まれる合成カンナビノイドによる細胞内 Ca²⁺に対する影響を検討した。

B. 研究方法

危険ドラッグ製品：全国 8 か所の衛生研究

所（国立医薬品食品研究所、北海道立衛生研究所、東京都健康安全研究センター、神奈川県衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、香川県環境保健研究センター、福岡県保健環境研究所）より 35 サンプルの提供を受けた(Table 1)。

植物片サンプルを秤量し、DMSO にて成分を抽出し、解析に使用した。

細胞樹立: CHO 細胞にヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞を確立した。継代 24 時間後に評価に用いた。96 穴ブラックプレート(BD Falcon, NJ, USA)に 3.5×10⁴cells/well となるように播種し、37°C・5.0%CO₂ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、薬物添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。

C. 研究結果

危険ドラッグ製品の抽出成分の解析を行った。35 製品解析を実施し 30 製品からは合成カンナビノイドによる蛍光発光確認された(Fig. 1)。一方、5 製品からは蛍光発光は確認されなかった。機器分析との一致率は 100% であり、CB₁ 受容体発現安定細胞を利用した検出法の感度は極めて高いことが示された(Fig. 1, Table 1)。

D. 考察

本研究では、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を利用して、ヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし、CHO-CB₁ 細胞を確立した。CHO-CB₁ 細胞を使用して、細胞内 Ca²⁺を測定したところ、合成カンナビノイド CP-55,940 により蛍光強度が増大した。蛍光発光により、合成カンナビノイドの有無を判断できることが判明した。

流通していた危険ドラッグ 35 種類を CHO-CB₁ 細胞により解析した結果、機器分析との一致率は 100% であり、CB₁ 受容体発現

安定細胞を利用した検出法の感度は極めて高いことが示された。また、合成カンナビノイドの化学構造には依存しない検出法として有用である。流通している合成カンナビノイドの主要な作用点は CB₁ 受容体であることから、CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ簡便な検出方法の確立が、規制速度を上げ、「いたちごっこ」を断つために必須の技術であると考えられる。

以上の結果から、CHO-CB₁ 細胞は合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用を検出するための tool として応用できることが判明した。

E. 結論

本研究から、CHO-CB₁ 細胞を利用するカンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用強度を解析する評価システムは、合成カンナビノイドの検出に応用可能である。さらに、危険ドラッグの中枢作用および有害作用発現の迅速かつ高感度な評価法としても利用可能であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。

F. 参考文献

- 1) Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Luebbecke M., Wiggermann M., Ernst L. and Beuerle T.: Spice: a never ending story? Forensic Sci Int. 191: 58-63, 2009.
- 2) Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G.: International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev. 54:161-202, 2002.
- 3) 船田正彦: 合成カンナビノイド誘導体の薬物依存性並びに神経毒性の評価。平成 22 年度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総合研究事業）「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発症機序と乱用実態

把握に関する研究」(H21-医薬-一般-031)
研究報告書(主任研究者: 船田正彦)。

- 4) Svízenská I, Dubový P, Sulcová A.
Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and
CB2), their distribution, ligands and
functional involvement in nervous system
structures - a short review. Pharmacol
Biochem Behav 90: 501-511, 2008.
- 5) Cooper ZD, Haney M., Cannabis
reinforcement and dependence: role of the
cannabinoid CB1 receptor. Addict Biol. 13:
188-195, 2008.

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

- 1) 船田正彦: 危険ドラッグの薬物依存性と
細胞毒性. 日本薬学会第 135 年会. 神戸.
3 月 28 日. 2015.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他

特になし

Table. 1 危険ドラッグ（植物片製品）検出状況

ID	入手時期		製品名	合成カンナビノイド	カチノン系化合物	その他
	年	月				
1	2014	5	Ash Dutch Dragon NEW 2nd (14-YY71-005)	○	—	○
2	2014	6	総統 SOUTOU (14-YY71-012)	○	—	—
3	2014	9	RUSH trip II 14 (14-YY71-053)	○	—	—
4	2014	9	Ash Dutch Skunk 2nd new (14-YY71-111)	○	—	—
5	2014	11	Ash life new (14-YY71-136)	○	—	—
6	2012	2	PANDRA	○	—	—
7	2012	2	Spice Original	○	—	—
8	2012	2	BONZAI	○	—	—
9	2012	3	Double Bad	○	—	—
10	2012	7	The world	○	—	—
11	2014	12	MONSTER	—	○	—
12	2014	12	Screw Upper X orange	—	○	—
13	2014	12	MAHOROBA -Erotica- NEW edition	—	○	—
14	2014	12	FEELING Flesh	—	○	—
15	2014	12	NewUmbrella 2nd	—	—	—
16	2014	8	charley J Mach	○	—	○
17	2014	8	charley 3rd Navy	○	—	—
18	2014	8	RUSH 13th CRYSTAL	○	—	—
19	2014	9	Ash Pakalolo BlueBerry Kush NEW 2nd	○	—	—
20	2014	9	ASHJOKER THE BEST Summer HOLIDAYS 2nd	○	—	—
21	2014	5	剛 PLUS GOU BLACK 02	○	—	—
22	2014	5	Sex Friend	○	—	○
23	2014	5	Ash Green Eyes 2ND	○	—	—
24	2014	7	PANDORA Platinum Premium Tropical	○	—	—
25	2014	11	蛙 54	○	—	—
26	2012	7	MANIA FREAK	○	—	—
27	2012	7	MAHARAJA	○	—	—
28	2012	7	MOAI	○	—	—
29	2012	7	Fairy	○	—	—

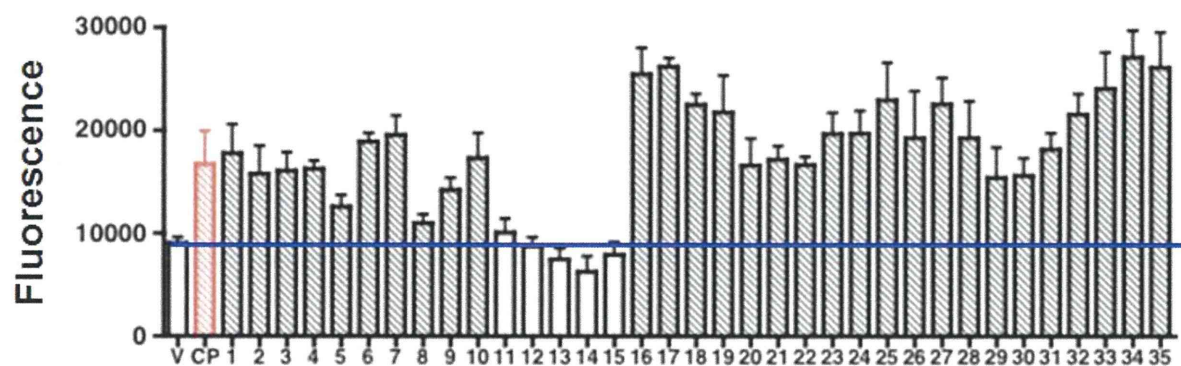


Fig. 1. Effects of extraction liquids from herbal products on the intracellular Ca^{2+} in CHO-CB₁ cells. CHO-CB₁ cells subsequently labeled with Fluo-4. Extraction liquids or synthetic cannabinoid CP-55,940 (CP, 30 μM) induced changes in intracellular Ca^{2+} were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. Data are expressed as the change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 6 such experiments. V: vehicle-treated group.

委託業務成果報告（分担）

新規流通危険ドラッグの危険性評価法の検討

担当責任者：花尻（木倉）瑠理（国立医薬品食品衛生研究所 生薬部）

研究協力者：曾我慶介（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）

研究協力者：蜂須賀暁子（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）

研究協力者：最上知子（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）

研究協力者：熊谷英敏（東京大学医学部附属病院 先端臨床医学開発講座）

研究協力者：池田祐一（東京大学医学部附属病院 ユビキタス予防医学講座）

研究協力者：内山奈穂子（国立医薬品食品衛生研究所 生薬部）

研究協力者：有竹浩介（筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構（IIIS））

研究協力者：神野透人（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）

研究協力者：香川（田中）聡子（国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部）

【研究要旨】

GPCRs が関与するセロトニン受容体及びオピオイド受容体に作用する危険ドラッグに着目し、以下の 4 課題を検討した。

1. 市販のセロトニン 5-HT_{2A} 受容体とエクオリンを安定に共発現する組換え細胞株を用いて、活性既知の麻薬 DOI と新規流通活性未知危険ドラッグ成分 4 化合物のセロトニン受容体活性を評価した。その結果、ほぼ活性の見られなかった 2-Methoxy-4,5- methylenedioxymethcathinone を除き、いずれも用量依存的に 5-HT_{2A} 受容体の活性化が認められ、DOI >> Allylexcaline > 3C-E > bk-2C-B であった。本アッセイに使用した細胞株は増殖機能を失った使い切りタイプのものであるが、細胞培養を必要とせず、直ちに発光基質の取り込みを行い、即日活性評価を行うことが可能であった。細胞培養施設を持たない機関であっても、発光を検出する装置があれば活性の検出が可能であり、コスト面で問題はあがあるが、汎用性に優れていた。

2. 5-HT_{2A} 受容体-Gq₁₁ 経路の活性化状態を NFAT-luciferase レポーター遺伝子によりモニターするアッセイ系を構築し、活性既知の麻薬 DOI と新規流通活性未知危険ドラッグ成分 7 化合物のセロトニン受容体活性を評価した。その結果、陽性コントロールの Serotonin に対し、既報よりも高感度なアッセイ系が確立できた。また、ほぼ活性の見られなかった N-OH-3,4-EDMA を除いて、その他化合物では用量依存的に 5-HT_{2A} 受容体の活性化が認められ、25D-NBOMe > DOI >> 4-OH MET > Allylexcaline > 3C-E >> bk-2C-B > 3,4-EDMA であった。さらに、DOI, Allylexcaline 及び 3C-E の活性値は、別途市販のアッセイ系で検討した値とほぼ同等の結果が得られた。コスト面、応用面で優れたアッセイ手法であると考えられる。

3. マウスに活性既知の麻薬 DMT 及び新規流通活性未知危険ドラッグ成分 7 化合物を投与し、自発運動量に及ぼす作用を調べた。同じセロトニン受容体アゴニストであっても、構造の違いにより作用に差が認められ、*in vitro* アッセイでは評価できない結果も得られた。行動量解析のような、*in vivo* における簡便な薬理作用の評価法検討も重要であると考えられる。

4. ヒト μ -オピオイド受容体 (MOR) に対してアンタゴニスト作用を有する危険ドラッグ成分を包括的にスクリーニングするための *in vitro* 評価系の構築を目的として、ヒト MOR の主要な Splice Variant である MOR-1 (OPRM1) の安定発現細胞作成を検討した。細胞内 cAMP 量を指標とするアゴニスト活性評価系の開発を進める予定である。

今後、各手法の頑健性を検討すると共に、化合物数を増やしてデータを蓄積し、*in vitro* と *in vivo* アッセイの相関性についても調査し、各手法の信頼性を高めていく必要があると考えられる。

A. 研究目的

危険ドラッグの中枢神経系に対する興奮・幻覚作用の蓋然性を検出・評価するためには、化学構造から得られる情報のみでは十分ではなく、生物学的な指標に基づく迅速な評価法が必要不可欠である。代表的な乱用薬物の主な標的部位としては、トリプタミン系化合物やフェネチルアミン系幻覚薬等の標的となるセロトニン受容体 (特に 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C})、モルヒネやサルビノリン A 等の標的となるオピオイド受容体 (特に μ -, κ -OPR), 大麻成分テトラヒドロカンナビノールや合成カンナビノイドの標的となるカンナビノイド受容体 (CB₁, CB₂) 等、G-タンパク質が介在する、いわゆる G タンパク質共役型受容体 (G-Protein coupled receptors, GPCRs) が知られている。その他にも、フェンシクリジン (PCP) やケタミンの標的となる NMDA 受容体などのイオンチャンネル型グルタミン酸受容体、覚せい剤等フェネチルアミン系やカチノン系化合物等の興奮薬が標的となるモノアミントランスポーター等が盛んに研究されている。平成 21 年以降、合成カンナビノイドとカチノン系化合物が危険ドラッグ市場流通の主流となっているが、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、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entanil, NMDA 受容体アンタゴニストであるメトキセタミン、

ジフェニジン及び PCP の誘導体等の危険ドラッグが次々と出現している¹⁾。これらは主に、医薬品開発途上で誕生した化合物であり、少量で極めて強い薬理作用を示す。すでに、様々な構造類似体が論文や特許情報で公開されていることから、今後もこれら化合物の出現が懸念されている。

本研究では、GPCRs が関与するセロトニン受容体及びオピオイド受容体に作用する危険ドラッグに着目し、受容体アゴニスト活性を検知することが可能なアッセイ法の確立を目的とし、以下の 4 課題を検討した。

1. 新規流通危険ドラッグ成分の Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay を用いたセロトニン受容体活性評価法の検討 (曾我, 蜂須賀, 最上)

Aequorin は、発光クラゲ *Aequorea aequorea* より単離された発光タンパク質で、アポタンパク質 Apoaequorin, 発光基質 Coelenterazine, 分子状酸素の複合体として存在する。カルシウムイオンと反応して発光 (470 nm) する性質を有し、蛍光よりも感度が高く、また、バックグラウンドも低いことから、生理的条件下の細胞内カルシウムイオン濃度変化の検出法として使用されている。GPCRs 関連では、標的となる GPCR, G タンパク質及び Ca²⁺ 感受性発光タンパク質 Aequorin の発現ベクターを CHO 細胞等にトランスフェクションして安定に共発現させ、リガンド結合により誘導された細胞内カルシウム濃度上昇を発光として検出するアッセイ系が報告されており、

すでに危険ドラッグ成分や危険ドラッグ製品の抽出物の活性評価にも適用されている²⁾⁴⁾

(Figure 1). 各種受容体とエクオリンを安定に共発現する組換え細胞株は市販されているが、中でも γ 線照射により増殖能力を失った形で小分けで市販されている製品は、細胞培養を必要とせず、解凍後直ちにアッセイに使用でき、迅速に受容体活性結果を得ることが可能である。本研究では、この市販の使い切りタイプのセロトニン (5-HT_{2A}) 受容体とエクオリンを安定に共発現する組換え細胞株を用いて、活性既知及び新規流通活性未知危険ドラッグの活性評価に適用し、その有用性を検証した。

2. 新規流通危険ドラッグ成分のレポーター遺伝子安定発現動物細胞を用いたセロトニン受容体活性評価法の検討 (熊谷, 池田)

5-HT_{2A} 受容体は内因性の生理的リガンドであるセロトニンにより刺激を受けると、細胞内シグナル伝達経路を活性化して様々な生理作用を引き起す。その主要な働きの一つは、細胞質へのカルシウム動員である。セロトニンが 5-HT_{2A} 受容体を刺激すると、細胞内の Gq₁₁ タンパク質で GDP-GTP 交換反応が起こり、GTP 結合型の Gq₁₁ タンパク質が、その標的分子の一つであるホスホリパーゼ C β の活性化を通じてイノシトール 3 リン酸 (IP₃) を産生する。IP₃ は二次情報伝達分子となり細胞内にカルシウム動員が誘導される結果、カルシウム依存性フォスファターゼである calcineurin が活性化する。Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) は活性化された calcineurin により脱リン酸化されると核内に移行し、その標的遺伝子の発現を引き起す (Figure 2)。そこで、本研究では、危険ドラッグが及ぼす 5-HT_{2A} 受容体-Gq₁₁ 経路の活性化状態を NFAT-luciferase レポーター遺伝子によりモニターするアッセイ系の確立を検討した。

3. 新規流通危険ドラッグ成分の自発運動量に及ぼす作用に関する研究 (内山, 有竹)

危険ドラッグの中樞神経系に対する作用の

蓋然性を迅速に網羅的に評価するためには *in vitro* アッセイが適しているが、*in vitro* アッセイの結果は生体内における代謝や脳への移行等を考慮しておらず、必ずしも実際に現れる薬理作用を反映しているとは限らない。次々と新たな化合物が検出される現状において、行動量解析のような、*in vivo* におけるより簡便な薬理作用の評価法も重要である。本研究では、構造的にセロトニン受容体に作用することが予測されるフェネチルアミン系やトリプタミン系の新規流通危険ドラッグを対象として、マウスの自発運動量に及ぼす作用を調べた。

4. 危険ドラッグ *in vitro* スクリーニング法の確立に向けた μ -オピオイド受容体 (MOR-1) 安定発現細胞株作成 (神野, 香川)

ヒト μ -オピオイド受容体 (MOR) に対して、細胞内 cAMP 量を指標とした、アゴニスト作用を有する危険ドラッグ成分を包括的にスクリーニングするための *in vitro* 評価系の構築を試みた。まずは、ヒト MOR の主要な Splice Variant である MOR-1 (OPRM1) の安定発現細胞作成を検討した。OPRM1 cDNA の 3'-末端に Myc Tag および DDK Tag をコードする塩基配列を結合した哺乳動物細胞発現ベクターを HEK293 細胞に Transfection し、抗生物質 G-418 による選択と単一細胞のクローニングを行った。

B. 研究方法

1. 新規流通危険ドラッグ成分の Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay を用いたセロトニン受容体活性評価法の検討 (曾我, 蜂須賀, 最上)

1) 測定対象化合物

使用した化合物は、Cayman chemical 社製もしくは国立衛研において調製したものを用いた。5-HT_{2A} 受容体アゴニストの陽性コントロールとして用いた TCB-2 [4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)methylamine], 活性既知の麻薬 DOI 及び活性未知の4種類の

化合物 [3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 2-Methoxy-4,5-methylenedioxy methcathinone (6-methoxymethylone)] の構造を Figure 3 に示す。

2) GPCRs を介した活性評価

ヒト 5-HT_{2A} 受容体, G タンパク質 (Gα₁₆), Aequerin を発現する CHO-K1 細胞 (5-HT_{2A} AequeScreen cell line, Perkin Elmer) を 3×10^5 cells/ml となるように調整し, 蛍光基質である Coelenterazine h を終濃度 5 μM となるように加え, 遮光下, 室温で 4 時間以上緩やかに攪拌し, その後 3 倍に希釈した細胞懸濁液 (1×10^5 cells/ml) を遮光下, 室温でさらに 1 時間攪拌したものを実験に供した。

化合物サンプル調製には, フェノールレッドを含まない D-MEM/F12 培地を用いて各化合物 (活性未知化合物 4 種類+DOI) の 10 段階の希釈系列を作成し, 予め 96well プレートに 50 μl 添加した。各 well に細胞懸濁液をオートインジェクターで 50 μl (5,000 cells) 添加し, 30 秒間の累積発光強度をルミノメーター EnVision (Perkin Elmer) で測定し, アゴニスト活性を求めた。ポジティブコントロール物質としては TCB-2 を同時に測定し, バックグラウンドには D-MEM/F12 培地, 最大反応量はジギトニンの発光強度を用いた。試料は 5 重測定 (n=5) を行い, 各測定値は累積発光強度の平均値からバックグラウンドの平均累積発光強度を差し引き, ジギトニン存在下における累積発光強度を 100% とした時の相対値で示した。解析は, 各化合物の希釈系列の Log 濃度を X 軸, 累積発光強度の相対値を Y 軸にプロットし, シグモイド曲線を作成し, 50% 効果濃度 (EC₅₀) を統計解析ソフト GraphPad Prism を用いて算出した。

2. 新規流通危険ドラッグ成分のレポーター遺伝子安定発現動物細胞を用いたセロトニン受容体活性評価法の検討 (熊谷, 池田)

1) 測定対象化合物

使用した化合物は, Cayman chemical 社製もしくは国立衛研において調製したものをを用い

た。5-HT_{2A} 受容体アゴニストの陽性コントロールとして用いた Serotonin, 活性既知の麻薬 DOI 及び活性未知の 7 種類の化合物 (4-OH-MET, 3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 25D-NBOM, 3,4-EDM, N-OH-3,4-EDMA) の構造を Figure 3 に示す。

2) 検定細胞株の樹立

CHO 細胞に NFAT-luciferase レポーター遺伝子をレトロウイルスを用いて感染導入した。感染細胞を Geneticin 含有培地で培養し, NFAT-luciferase レポーター遺伝子が安定的に導入された細胞を選別し, インディケーター細胞株を樹立した。このインディケーター細胞株に, 更にヒト由来 5-HT_{2A} 受容体遺伝子をレトロウイルスを用いて感染導入した。5-HT_{2A} 受容体発現インディケーター細胞は Puromycin 含有培地で選別し, 樹立した。細胞株は, 通常培地 (5% 牛胎児血清, 1% 非必須アミノ酸溶液, 0.5mg/ml Geneticin, 10 μg/ml Blasticidin, 10 μg/ml puromycin 1% ペニシリンストレプトマイシン溶液含有 DMEM 培地) で培養し, 3~4 日に一度継代培養することで維持した。

3) 検定細胞株を用いた化合物の評価

実験初日に, ヒト 5-HT_{2A} 受容体発現インディケーター細胞を 96 ウェルホワイトマイクロプレートに播種 (30,000 個/ウェル) し, 通常培地中 37°C で一晚培養した。翌日, 培養液を吸引除去し, アッセイ培地 (0.1% BSA 含有 Opti-MEM I) を 100 μl 添加し, 更に 21 時間以上培養した。実験 3 日目に各ウェルにアッセイ培地 (50 μl) に希釈した披験物質を添加し, 37°C で 6 時間培養した。培養終了後, 培養液を吸引除去し, Steady-Glo ルシフェラーゼ試薬 (50 μl, プロメガ社) を添加した。ルシフェリン発光は, ARVO マルチラベルリーダー (パーキンエルマー社) で測定した。

3. 新規流通危険ドラッグ成分の自発運動量に及ぼす作用に関する研究 (内山, 有竹)

1) 使用動物

C57BL/6 系雄性マウス (9 週齢, 体重 21-24

g) を日本エスエルシー株式会社より購入した。

2) 飼育方法

マウスは 12 時間ごとの明暗周期下で、飼料と水を自由に摂取させた。

3) 薬物投与

使用した化合物は、Cayman chemical 社製もしくは国立衛研において調製したものをを用いた。フェネチルアミン系 5 化合物 (3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 25D-NBOMe, 3,4-EDMA, *N*-OH-3,4-EDMA) は、生理食塩水に溶解させた。トリプタミン系化合物の DMT (活性既知の麻薬) 及び 4-OH-MET は、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た。マウスに各 5 mg/kg または 50 mg/kg の用量で腹腔内投与 (intraperitoneal administration: i.p.) 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)。

4) 自発運動量測定

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。行動量は、動物から放出される赤外線を検出するセンサー (Biotex Japan 社) とソフトウェア Biotex 16CH Act Monitor BAI2216 (Biotex Japan 社) を用いて 1 分毎の行動量を 48 時間記録した。自発運動量は、投与後 1 時間毎の累積量と、投与 0-3 時間後及び 3-6 時間後の累積量を 1 日目のコントロールを 100% として算出し、化合物投与後のそれぞれの累積値と比較した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、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。

4. 危険ドラッグ *in vitro* スクリーニング法の

確立に向けた μ -オピオイド受容体 (MOR-1) 安定発現細胞株作成 (神野, 香川)

1) 細胞

ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 (HEK293) 細胞 (JCRB9068) は独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。293 細胞は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco Life Technologies, Rockville, MD, USA, cat. No. 11995-065) 培地に非動化した牛胎児血清 (Gibco, cat. No. 16000-036), MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco cat. No. 11140-0509) および GlutaMAX™ Supplement (Gibco cat. No. 35050-061) を終濃度としてそれぞれ 10%, 0.1mM, 2 mM となるように添加した培養液を用いて、37°C, 5% CO₂ 環境下で培養した。

2) 遺伝子導入

ヒト μ -O オピオイド受容体 (transcript variant MOR-1) タンパク質をコードする完全長 cDNA (Figure 4) を哺乳動物細胞発現ベクター pCMV-Entry vector (Figure 5) に組み込んだクローン (cat. No. SC119609) ならびに受容体タンパク質の C 末端側に Myc/DDK タグを融合発現させるためのクローン (cat. No. RC210383) を OriGene 社 (Rochville, MD, USA) より購入した。6 well plate (培養面積 9.6 cm²) に HEK293 細胞を 5×10⁵ 個播種し、24 時間後に Lipofectamine 3000 Reagent (Invitrogen, Life Technologies) を用いてプロトコールに従ってトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に培養培地に交換し、その 2 日後から G418 (Gibco cat. No.10131035) によるセレクションを開始した。G418 の添加濃度はあらかじめ至適濃度を検討して 500 μ M とし、単一細胞のクローニングは限界希釈法を用いた。

C. 研究結果

1. 新規流通危険ドラッグ成分の Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay を用いた受容体活性評価法の検討 (曾我,