

蜂須賀, 最上)

化合物濃度と 5-HT_{2A} 受容体活性である相対累積発光強度の反応曲線を Figure 6 に示す。ポジティブコントロール物質として用いた 5-HT_{2A} 受容体アゴニスト TCB-2 の EC₅₀ は 0.58 nM で良好な反応曲線を示した。活性既知の DOI も TCB-2 と同程度の活性を示し、EC₅₀ は 0.49 nM であった。活性報告はされていないが、その構造から反応性が疑われる Allylescaline, 3C-E 及び bk-2C-B については、前 2 者の反応最大値は TCB-2 と同程度でありし、後者の反応最大値は TCB-2 の 70%程度を示し、EC₅₀ は各々 34 nM, 86 nM, 330 nM であった。一方、2-Methoxy-4,5-methylenedioxy methcathinone (6-Methoxymethylone) に関しては、0.1 mM という高濃度では細胞の発光を数%確認することができたものの反応性は非常に弱かった。

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)

本アッセイ系を用いて 7 種類の新規流通危険ドラッグ (3C-E, Allylescalin, bk-2C-B, 4-OH-MET, 25D-NBOMe, 3,4-EDMA, N-OH-3,4-EDMA) 及び活性既知麻薬 DOI を評価した。その際、陽性コントロールとして Serotonin を用いた。今回、確立したアッセイ系での Serotonin の EC₅₀ はおよそ 3 nM (Table 1) であり、既報⁹⁾のラジオリガンド競合結合法 (セロトニンに対する EC₅₀, 4.84 nM) 及び IP₃ 蓄積定量法 (セロトニンに対する EC₅₀, 5.17 nM) より高感度のアッセイ系を確立することができた。また、本アッセイ系はラジオアイソトープを使用しない安全性の高く簡便な方法である利点を有する。

ほぼ活性の見られなかった N-OH-3,4-EDMA を除いて、被検化合物は用量依存的にヒト 5-HT_{2A} 受容体の活性化が見られた (Figure 7)。3,4-EDMA は、最大効力が Serotonin の 80%とパーシャルアゴニストであり、アミノ基への水酸基の導入でほぼ活

性が消失することが明らかとなった。陽性コントロールの DOI と 25D-NBOMe の最大効力は Serotonin よりも高く、また 25D-NBOMe の EC₅₀ は 0.22 nM と DOI の 2.5 倍ほど強力であった。

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) 自発運動量の経時的变化

各薬物をそれぞれ投与した場合の、投与後 1 時間毎の自発運動累積量の経時変化を、Figure 8a-f 及び Figure 9a-d に示した。

3C-E を 5 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後で自発運動量は増加したが有意な差はみられなかった (Figure 8a)。さらに、50 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後までは有意差はないものの減少傾向がみられ、その後投与 2~3 時間後まで有意に自発運動量は増加した (Figure 8b)。Allylescaline を 5 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後まで自発運動量は有意に増加した (Figure 8c)。さらに、50 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後までは自発運動量は有意に減少し、その後投与 3 時間後では逆に自発運動量は有意に増加した (Figure 8d)。次に、カチノン系化合物 bk-2C-B を 5 mg/kg 投与した場合、有意な差はみられなかった (Figure 8e)。さらに、50 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後までは自発運動量は有意に減少した (Figure 8f)。

次に、トリプタミン系化合物 4-OH-MET を 5 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後まで自発運動量は有意に減少した (Figure 9a)。陽性対照である DMT を同濃度投与した場合も、投与 1 時間後まで自発運動量は有意に減少し、投与 3 時間後では増加した (Figure 9b)。

さらに、エチレンジオキシ基を有するフェネチルアミン系化合物 N-OH-3,4-EDMA を 5 mg/kg 投与した場合、投与 1 時間後まで自発運動量は有意に減少した (Figure 9c)。また、3,4-EDMA を同濃度投与した場合、有意差はないものの、自発運動量は減少傾向がみられた (Figure 9d)。

以上、フェネチルアミン系化合物 3C-E 及び Allylescaline に関しては、低濃度では投与直後から自発運動量の増加傾向がみられ、高濃度では投与直後（1 時間後まで）では自発運動量は減少し、その後増加に転じた。従って、両化合物ともに低濃度投与と高濃度投与では作用の発現形態が異なっていた（Figures 8a,c and Figures 8b, d）。カチノン系化合物 bk-2C-B については、3C-E 及び Allylescaline と異なり、高濃度投与でも自発運動量は減少した（Figure 8f）。また、トリプタミン系化合物 4-OH-MET, DMT, エチレンジオキシ基を有するフェネチルアミン系化合物 *N*-OH-3,4-EDMA, 3,4-EDMA を投与した場合、投与 1 時間後まで自発運動量は減少した（Figure 8a-d）。

2) 累積自発運動量

各薬物投与 0-3 時間後及び 3-6 時間後におけるマウスの累積自発運動累積量を、コントロールを 100%として算出し、Figure 10 に示した。左側に投与 0-3 時間後（a）、右側に投与 3-6 時間後（b）の累積量を示した。

投与 0-3 時間後においては（Figure 10a）、3C-E 50mg/kg 及び Allylescaline を 5 mg/kg 投与した場合、マウスの自発運動量はそれぞれ 181%, 165%まで有意に増加した。一方、カチノン系化合物 bk-2C-B を 50 mg/kg, トリプタミン系化合物 4-OH-MET を 5 mg/kg 投与した場合、自発運動量はそれぞれ 54%, 48%まで有意に減少した。

投与 3-6 時間後においては（Figure 10b）、Allylescaline を 50 mg/kg 投与した場合、マウスの自発運動量は 184%まで有意に増加した。また、他の化合物については、自発運動量の変化はみられるものの、有意差は認められなかった。

以上、フェネチルアミン系化合物 3C-E 及び Allylescaline はマウスの自発運動量を有意に増加させた。一方、カチノン系化合物 bk-2C-B, トリプタミン系化合物 4-OH-MET, DMT, エチレンジオキシ基を有するフェネチルアミン系化合物 *N*-OH-3,4-EDMA はいずれ

もマウスの自発運動量を有意に減少させた。また、3,4-EDMA は、有意差はないものの自発運動量の減少傾向がみられた。

なお、今回検討した化合物投与後のマウスの行動を観察したところ、フェネチルアミン系化合物 3C-E 及び Allylescaline を高濃度投与した場合、投与 10 分後から痙攣がみられ、その後度々繰り返して痙攣がみられた。カチノン系化合物 bk-2C-B を高濃度投与した場合は投与 10 分後から不動状態がみられた。また、トリプタミン系化合物 4-OH-MET, DMT, エチレンジオキシ基を有するフェネチルアミン系化合物：*N*-OH-3,4-EDMA 及び 3,4-EDMA 投与後においても、同じく投与 10 分後から不動状態がみられた。

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)

本研究では MOR-1 を安定的に発現する細胞株の樹立に向けた検討を行った。OPRM1 cDNA の 3'-末端に *in frame* で Myc Tag および DDK (FLAG) Tag をコードする DNA を組み込んだ哺乳動物細胞発現ベクター pCMV-OPRM1 を HEK293 細胞に Transfection したのちに、形質転換した細胞を抗生物質 G-418 添加培地で選択し、現在、安定的発現細胞の Cloning を進めている。本研究で導入した OPRM1 遺伝子の Open Reading Frame は 1203 bp, 予想されるタンパク質 (MOR-1) の分子量は 44.6 kDa であり、最終的に MOR-1 の発現を抗 DDK Tag 抗体を用いる Western Blotting により確認したのちに *in vitro* アッセイに使用する予定である。

D. 考察

1. 新規流通危険ドラッグ成分の Aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay を用いた受容体活性評価法の検討 (曾我, 蜂須賀, 最上)

今回用いた細胞レポーターアッセイ法は、

凍結細胞を融解したのち、培養せずに直ちに発光基質の取り込みを行い、即日活性測定を行うことができる。培養せずに測定を行えるということは細胞培養施設を持たない機関であっても、活性測定を行うことが可能であり、汎用性に優れている。本アッセイ法においては、今回用いたセロトニン 5-HT_{2A} 受容体発現系だけではなく、カンナビノイド CB₁, CB₂ 受容体、各種オピオイド受容体等、代表的な中枢神経系の GPCRs 発現系も市販されていることから、これらを使用すれば、簡便に、危険ドラッグの迅速な活性スクリーニングが可能と考えられる。今後、細胞の安定性、反応再現性などを詳細に検討し、測定系の頑健性を調べると共に、化合物でのデータを蓄積し、*in vivo* 系との相関性についても調査し、測定法の信頼性を高めていく必要があると考えられる。また、過去に危険ドラッグ成分が添加されている乾燥植物細片製品の抽出物について、今回検討したアッセイ系と同様の Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay を用いて活性評価を実施した例はあるが^{2),3)}、今回用いた市販製品についても、様々な薬物が混在する実際の危険ドラッグ製品の抽出物を用いて評価を行う必要がある。

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）

今回構築したレポーター遺伝子安定発現動物細胞を用いて測定した危険ドラッグ成分のセロトニン受容体活性（EC₅₀ 値）と、市販のセロトニン受容体とエクオリンを共発現する組換え細胞を用いて測定した活性（EC₅₀ 値）を比較すると、bk-2C-B については、それぞれ 8300 nM, 330 nM と乖離が認められたが、陽性コントロールとなる DOI がそれぞれ、0.58 nM と 0.49 nM, 3C-E は 92 nM と 86 nM, Allylescaline は 72 nM と 34 nM となり、ほぼ同等の結果が得られた。

市販の組み替え細胞株が数百万円、増殖能力を失った使い切りタイプのもの（解凍後 1

～2 日で使用、96 穴プレート最大 20 枚程度）でも十万円以上することを考慮すると、特に少数の試料の活性評価を行う場合は市販品ではコスト面で問題がある。また市販品ではライセンス上の問題もあるため、細胞株そのものに自由に修飾を加えることができない。これらを考慮すると、今回構築したレポーター遺伝子安定発現動物細胞を用いた活性評価は培養等に時間はかかるものの、コスト面でも、応用面でも有用であると考えられる。

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）

今回検討した化合物は、代表的な幻覚剤のアナログであるが、一口に幻覚剤と言っても、動物の自発運動量に及ぼす作用の発現時間やその行動形態などは構造により異なることが示された。化合物によって作用発現が違う原因は不明であるが、可能性の一つとして化合物のタイプにより、吸収、代謝、排泄速度の違いなどの影響が考えられる。今後、例えば幻覚系と考えられる化合物についても、様々な化合物の自発運動量や行動を詳細に調べることで、化合物を作用の面から細分化して分類できる可能性も考えられる。

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）

MOR-1 アゴニストは G タンパク質を介する Adenylate Cyclase 抑制による細胞内 cAMP の減少、内向き整流性 K⁺チャネルの活性化によって作用を発現する。したがって、本研究で樹立する HEK293/MOR-1 細胞を用いた *in vitro* アッセイでは、細胞内 cAMP を市販の Competitive ELISA キットを用いて定量し、アゴニスト活性を評価することが可能である。しかし、Competitive ELISA による定量は操作が煩雑で、*in vitro* アッセイのスループットを向上させるうえで律速となるおそれがあることから、現在、cAMP 検出系を備えた細胞株の樹立についても検討を開始した。すなわち、

GloSensor AMP Assay (Promega) を利用し、cAMP 結合タンパク質の一部を挿入したホタルルシフェラーゼ（バイオセンサー）と MOR-1 を HEK293 細胞で共発現させ、バイオセンサーへの cAMP の結合による構造変化をルシフェラーゼ活性として測定して cAMP 量を測定するものである。

さらに、Figure 11 に代表的な Splice Variant の Alignment を示したように、ヒト *OPRM1* 遺伝子には 19 もの Splice Variant が存在すること、マウスの *OPRM1* は脳内で部位特異的なパターンで Splice Variant が発現することが明らかとされている。そこで、今後ヒト *OPRM1* 遺伝子の主要な Splice Variant についても上記の *in vitro* 評価系を作成し、危険ドラッグ中のオピオイド受容体アゴニストの包括的な評価と生体影響の予測が可能な試験系の構築を進める予定である。

E. 結論

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-methylenedioxy methcathinone 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。

F. 参考文献

1) 厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機

器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「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(H24-医薬-一般-031)」平成24年度、25年度及び26年度研究分担報告「危険ドラッグ製品中の新規流通危険ドラッグ成分の同定」(内山奈穂子)。

- 2) 厚生労働科学特別研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究(H18-医薬-一般-017)」平成19年度分担研究報告「違法ドラッグ成分の aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay による GPCR 活性評価法の検討」花尻(木倉)瑠理

- 3) 花尻(木倉)瑠理、内山奈穂子、合田幸広、藪下尚智、飯田満「植物系違法ドラッグ製品の aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay による GPCRs 活性評価法の検討」日本薬学会第128年会発表要旨

- 4) 厚生労働科学特別研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究(H21-医薬-一般-030)」平成22年度分担研究報告「5-MeO-EPT 及び ALEPH-4 の aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay によるセロトニンレセプターアゴニスト活性評価」花尻(木倉)瑠理

- 5) Braden MR., Parrish JC., Naylor JC., Nichols DE., Molecular interaction of serotonin 5-HT_{2A} receptor residues Phe339(6.51) and Phe340(6.52) with superpotent N-benzyl phenethylamine agonists. Mol. Pharmacol. 70: 1956-1964, 2006.

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

2. 学会発表

- 1) 蜂須賀暁子, 曾我慶介, 最上(西巻)知子, 花尻(木倉)瑠理, 新規流通危険ドラッグのエクオリン/受容体共発現組換え細胞を用いた薬理活性評価, 法中毒学会 第34年会(2015.6, 福岡, 発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

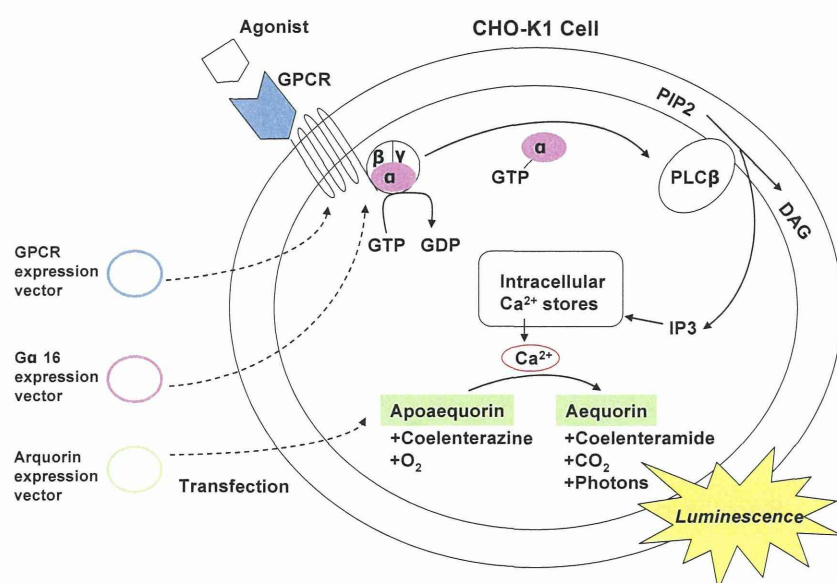


Figure 1 Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay schematic

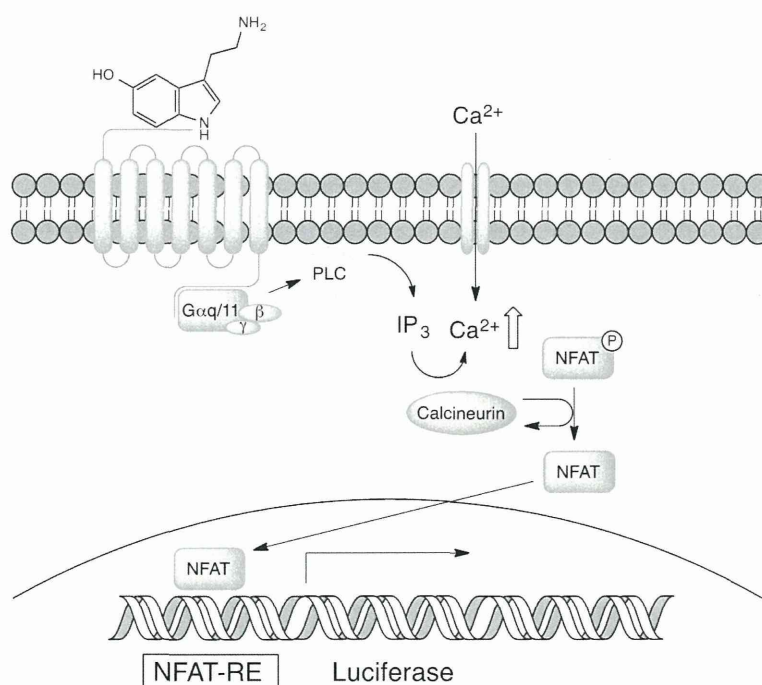


Figure 2 NFAT-luciferase reporter assay on human 5-HT_{2A} receptor schematic

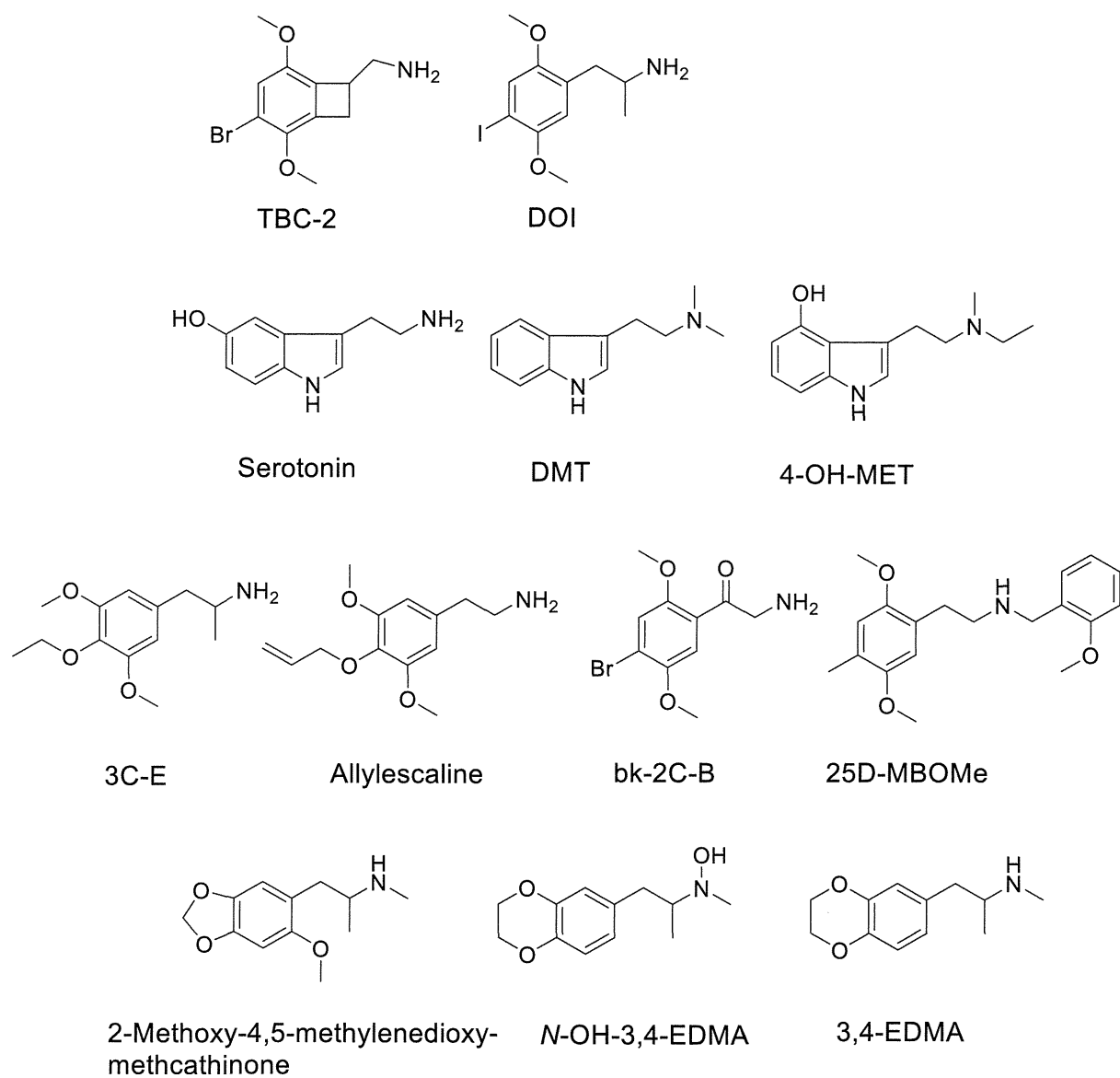


Figure 3 Chemical structures of typical serotonin receptor agonists and target substances investigated in this study

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
OPRM1  ATGGACAGCAGCGCTGCCCCCAGCAACGCCAGCAATTGCACGTATGGCTTGGCGTACTCAAGTTGCTCCCCAGCACCAG
      90     100     110     120     130     140     150     160
OPRM1  CCCCGETTCCTGGGTCAACTTGTCCCACCTTAGATGGCAACCTGTCCGACCCATGCGGTCCGAACCGCACCGACCTGGGCG
     170     180     190     200     210     220     230     240
OPRM1  GGAGAGACAGCCTGTGCCCTCCGACCGGCAGTCCCTCCATGATCAGGCCATCACGATCATGGCCCTCTACTCCATCGTG
     250     260     270     280     290     300     310     320
OPRM1  TGGCTGGTGGGGCTCTTCGGAAACTTCCTGGTCATGTATGTATGTCAGATACACCAAGATGAAGACTGCCACCAACAT
     330     340     350     360     370     380     390     400
OPRM1  CTACATTTTCAACCTTGCTCTGGCAGATGCCTTAGCCACCAGTACCCGCCCCCTCCAGAGTGTGAATTACCTAATTGGGAA
     410     420     430     440     450     460     470     480
OPRM1  CATGGCCATTTGGAAACCATCCTTTGCAACATAGTGAATCCATAGATTACTATAACATGTTCCACGACATATTCACCCTC
     490     500     510     520     530     540     550     560
OPRM1  TGCACCATGAGTGTGATCGATACATTGCAGTCTGCCACCCCTGCAAGGCCCTTAGATTTCCTGACTCCCCGAAATGCCAA
     570     580     590     600     610     620     630     640
OPRM1  AATTATCAATGTCTGCAACTGGATCCTCTCTTCAGCCATTGGTCTTCCGTGTAATGTTTCATGGGTACAAACAAATACAGGC
     650     660     670     680     690     700     710     720
OPRM1  AAGGTTCATAGATTGTACTACTAATCTCTCATCCACCTGGTACTGGGAAAACCTGCTGAAGATCTGTCTTTTCATC
     730     740     750     760     770     780     790     800
OPRM1  TTCGCCTTCATTATGCCAGTGTCTCATCATTAACCGTGTGCTATGGACTGATGATCTTGGCCTCAAGAGTGTCCGCATGCT
     810     820     830     840     850     860     870     880
OPRM1  CTCGTGGCTCCAAAGAAAAGGACAGGAATCTTCGAAGGATCACCAGGATGGGTGCTGGTGGTGGTGGCTGTGTTCAATCCTCT
     890     900     910     920     930     940     950     960
OPRM1  GCTGGACTCCCATTCACATTTACGTATCATTAATAAGCCTGGTTACAATCCCAGAACTACGTTCCACACTGTTTCCTGG
     970     980     990    1000    1010    1020    1030    1040
OPRM1  CACTTCTGCATTGCTCTAGGTACACAAACAGCTGCCCAACCCAGTCCCTTTATGCATTTCTGGATGAAAACTTCAAACG
    1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
OPRM1  ATGCTTCAGAGAGTTCTGTATCCCAACCTCTTCCAACATTGAGCAACAAAACCTCCACCTCGAATTCTGTCAGAACACTAGAG
    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
OPRM1  ACCACCCCTCCACGGCCAAACAGTGGATAGAACTAAATCATCAGCTAGAAAATCTGGAGGCAGAACTGCTCCGTTGCC
OPRM1  ...TAA

```

Figure 4 Sequence of OPRM1 cDNA (NM_000914.4)

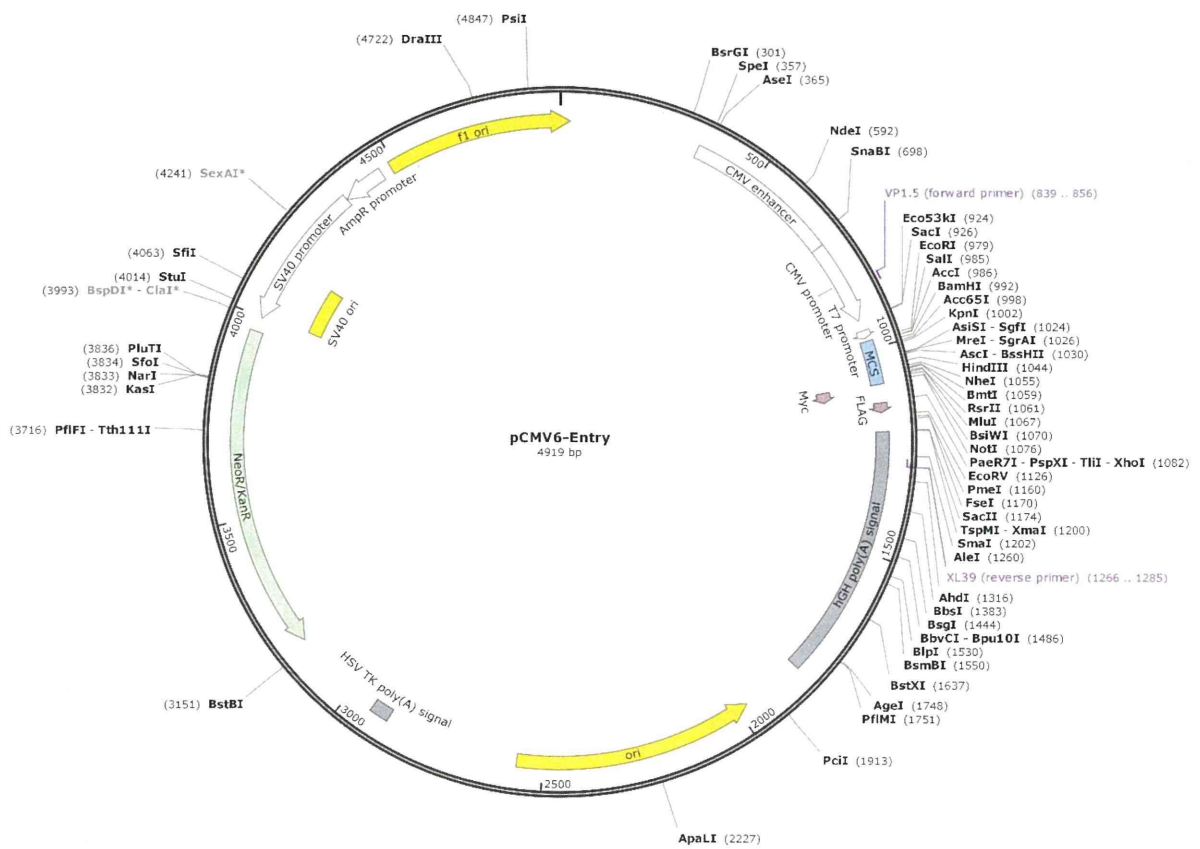


Figure 5 Plasmid map of pCMV6-Entry
Human OPRM1 cDNA was inserted between the Sgf I and Mlu I sites in the multi cloning site.

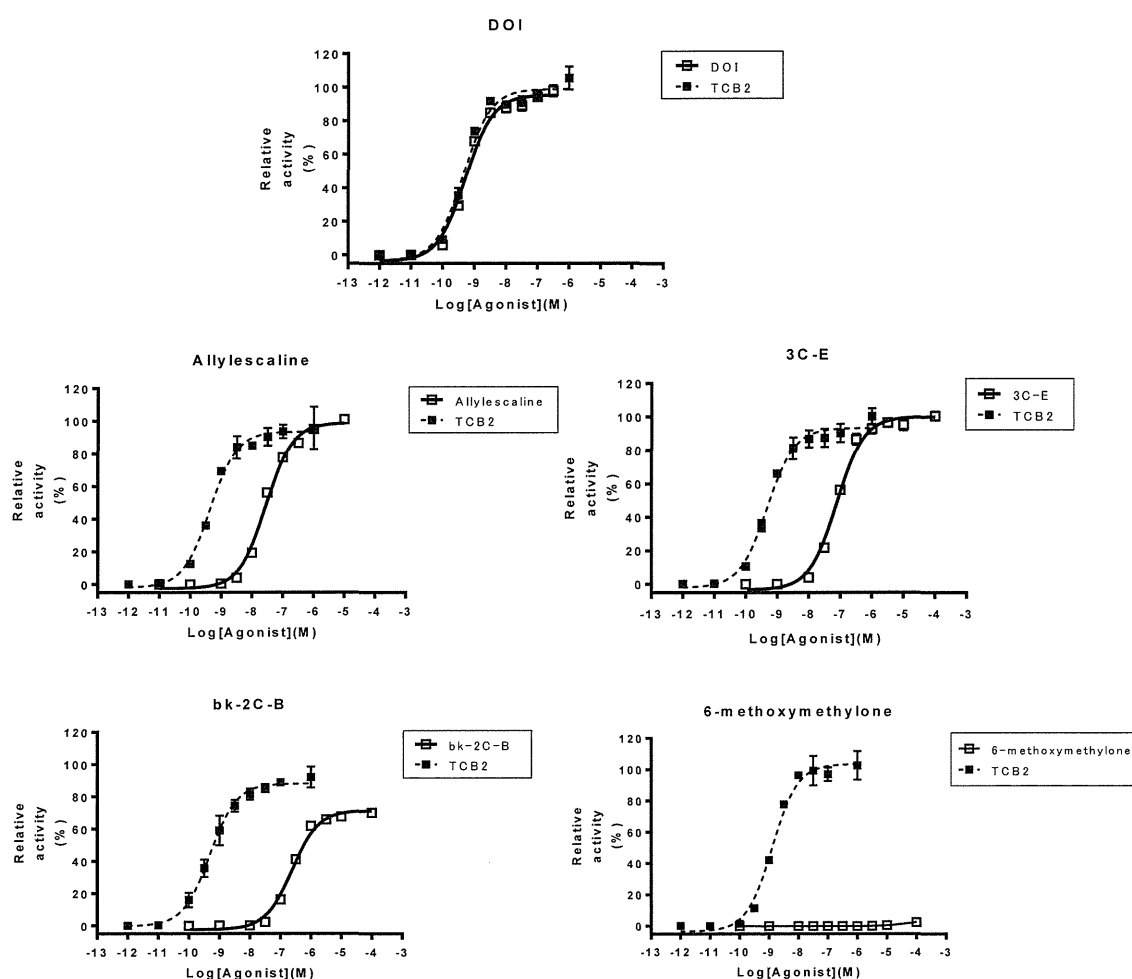


Figure 6 Concentration-activity curves of positive controls (TCB-2 and DOI) and 4 new psychoactive substances [Allylescaline, 3C-E, bk-2C-B and 2-Methoxy-4,5-methylenedioxymethcathinone (6-Methoxymethylone)] obtained from the Aequorin/GPCR (5-HT2A) cell-based Ca^{2+} functional assay

Table 1 EC_{50} values of positive controls (TCB-2 and DOI) and 4 new psychoactive substances [3C-E, Allylescaline, bk-2C-B and 2-Methoxy-4,5-methylenedioxymethcathinone (6-Methoxymethylone)] for the Aequorin/GPCR (5-HT2A) cell-based Ca^{2+} functional assay

Substances	EC_{50} (nM)
3C-E	86
Allylescaline	34
bk-2C-B	330
2-Methoxy-4,5-methylenedioxymethcathinone (6-Methoxymethylone)	—
DOI	0.49
TCB-2	0.58

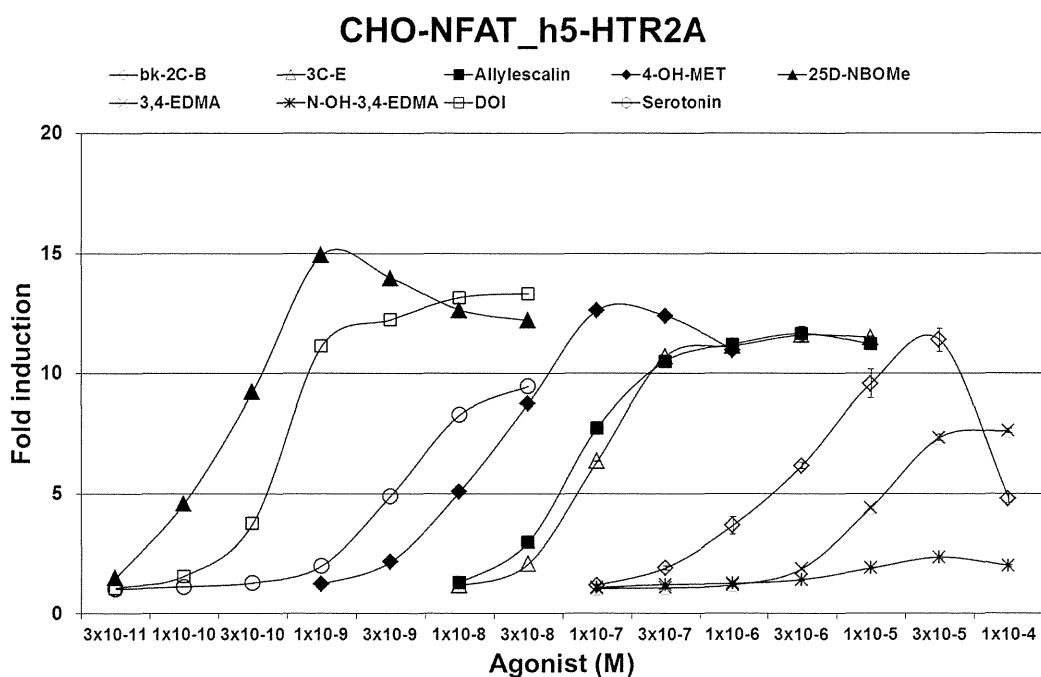
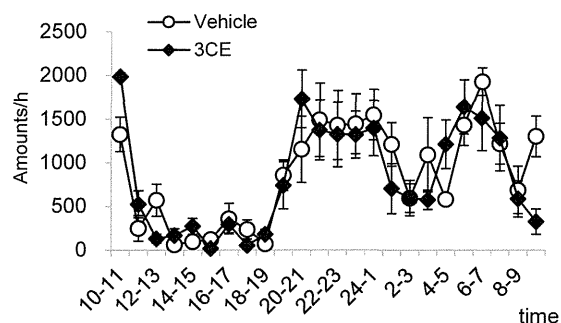


Figure 7 Concentration-activity curves of positive controls (serotonin and DOI) and 6 new psychoactive substances [bk-2C-B, 3C-E, Allylescaline, 4-OH-MET, 25D-NBOMe, 3,4-EDMA and *N*-OH-3,4-EDMA] obtained from the NFAT-luciferase reporter assay on human 5-HT2A receptor

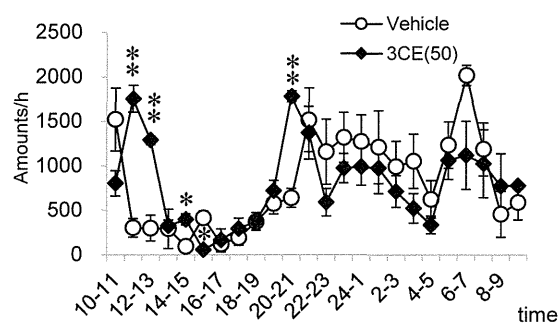
Table 2 EC₅₀ values of positive controls (serotonin and DOI) and 6 new psychoactive substances [bk-2C-B, 3C-E, Allylescaline, 4-OH-MET, 25D-NBOMe, 3,4-EDMA and *N*-OH-3,4-EDMA] for the NFAT-luciferase reporter assay on human 5-HT2A receptor

Substances	EC ₅₀ (nM)
3C-E	92
Allylescaline	72
bk-2C-B	2,600
4-OH-MET	17
25D-MBOMe	0.22
3,4-EDMA	8,300
<i>N</i> -OH-3,4-EDMA	—
DOI	0.58
Serotonin	2.9

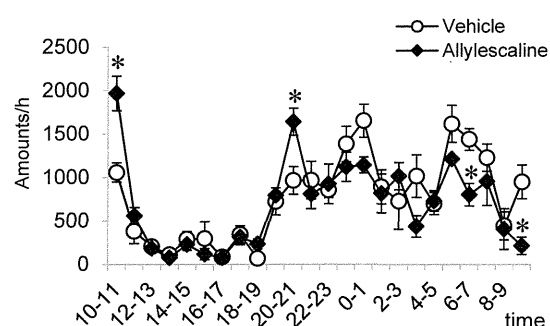
(a) 3CE (5 mg/kg i.p.)



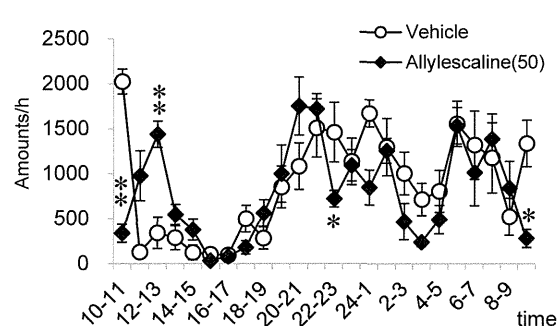
(b) 3CE (50 mg/kg i.p.)



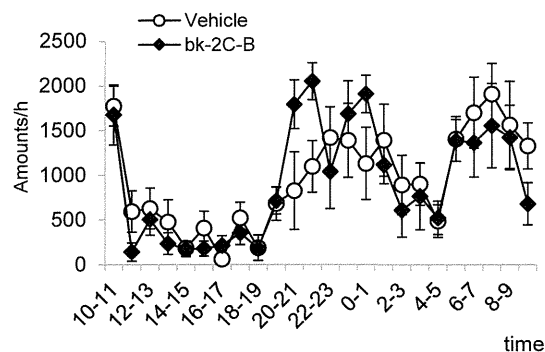
(c) Allylescaline (5 mg/kg i.p.)



(d) Allylescaline (50 mg/kg i.p.)



(e) bk-2C-B (5 mg/kg i.p.)



(f) bk-2C-B (50 mg/kg i.p.)

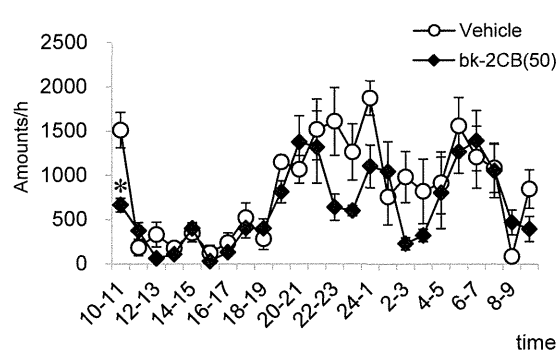
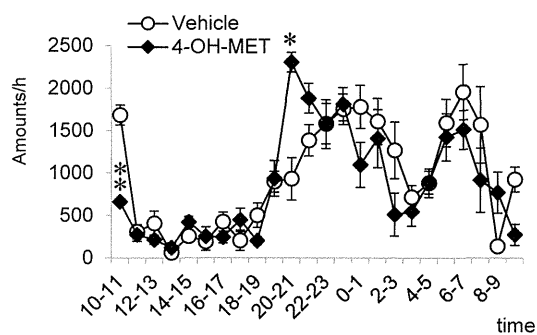
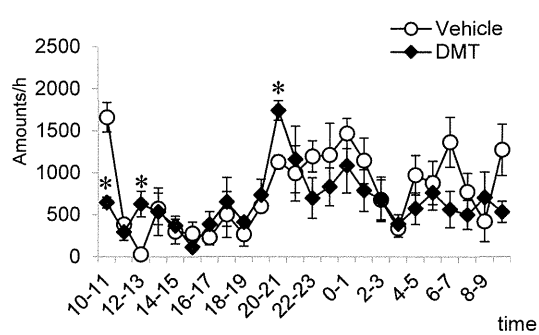


Figure 8 Time courses of the locomotor activity after i.p. injections of compounds 3C-E, Allylescaline and bk-2C-B at 5 mg/kg (a, c, e) and 50 mg/kg (b, d, f) in mice. Each value is shown as the locomotor count for 1 h. Values are means $\pm$ SEM ($n = 4$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significant difference from the vehicle injection.

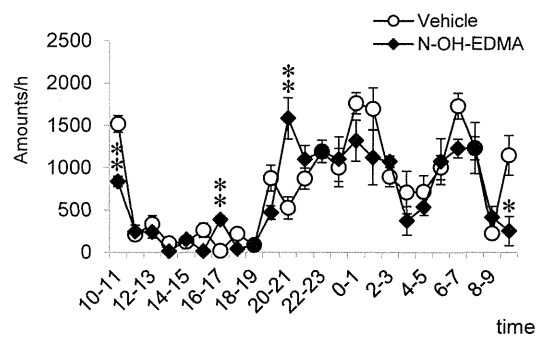
(a) 4-OH-MET (5 mg/kg i.p.)



(b) DMT (5 mg/kg i.p.)



(c) N-OH-3,4-EDMA (5 mg/kg i.p.)



(d) 3,4-EDMA (5 mg/kg i.p.)

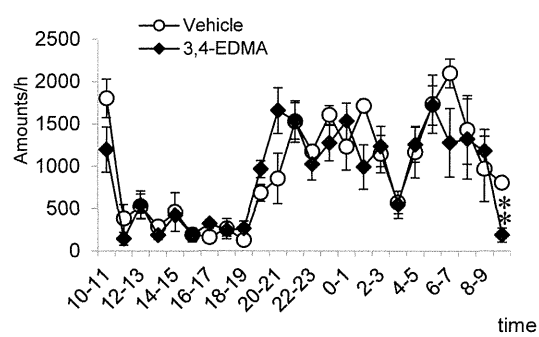


Figure 9 Time courses of the locomotor activity after i.p. injections of 4-OH MET, DMT, N-OH-3,4-EDMA and 3,4-EDMA at 5 mg/kg in mice. Each value is shown as the locomotor count for 1 h. Values are means $\pm$ SEM ($n = 4$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significant difference from the vehicle injection.

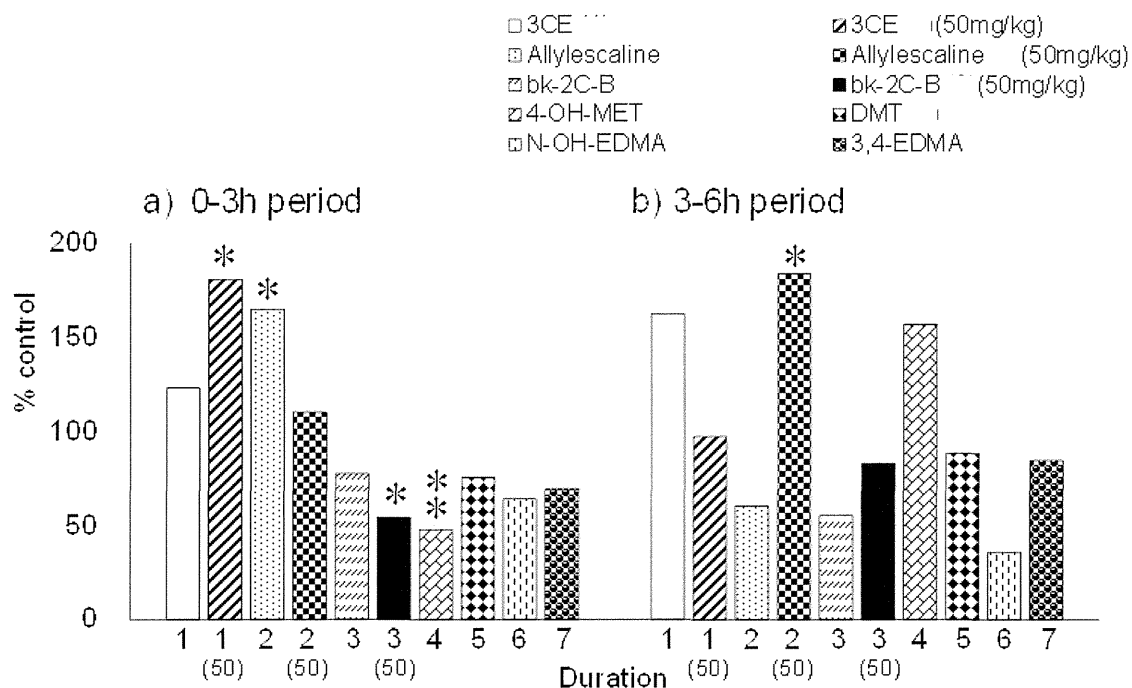


Figure 10 Total amounts of locomotor activity during a 0-3-h (a) and 3-6-h period (b) after injections of 3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 4-OH-MET, DMT, N-OH-3,4-EDMA and 3,4-EDMA at 5 mg/kg or at 50 mg/kg in mice. Each value is shown as a percentage of the control value in animals treated with a vehicle. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significant difference from the vehicle injection.

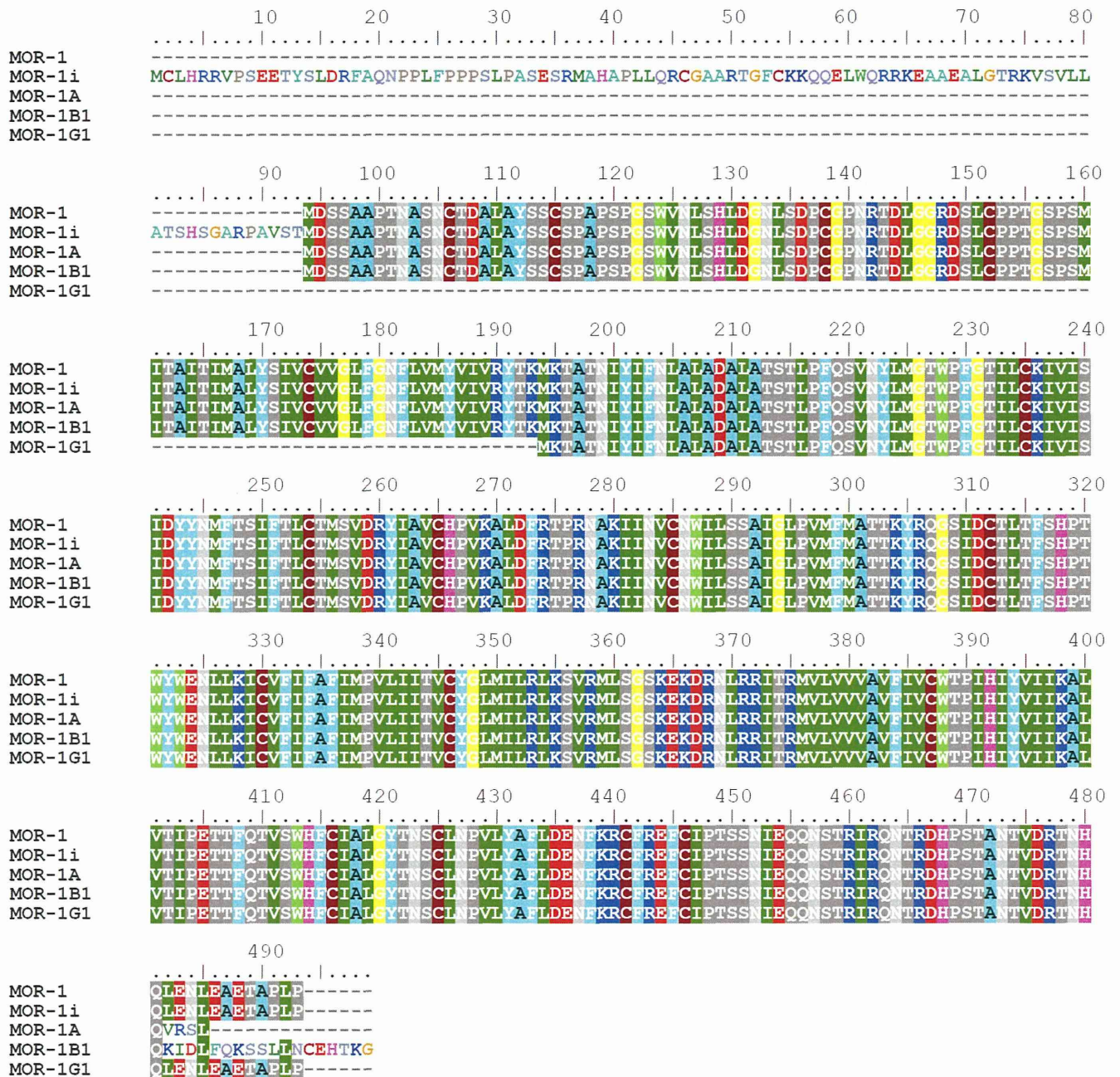


Figure 11 Alignment of the deduced amino acid sequences of the representative MOR-1 splice variants.

委託業務成果報告（分担）

危険ドラッグに含まれる薬物成分の機器分析

担当責任者：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）

【研究要旨】

平成 26 年度に行った流通製品中における向精神作用を有する薬物の調査結果を報告する。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、アセチルフェンタニル）であった。

A. 研究目的

東京都では平成 17 年 4 月から「東京都薬物の濫用防止に関する条例」により知事指定薬物を指定し、都内における危険（脱法）ドラッグの監視を強化した。国は平成 19 年 4 月に薬事法を改正して指定薬物を指定し、全国的に監視を強化した。これらの対策で一時的に取扱店は減少したものの、平成 24 年末には全国に危険ドラッグ取扱店が 305 軒あることが報告された。また、使用者の救急搬送・不審行動・死亡・交通事故事例も報告されている。また、東京・池袋で平成 26 年 6 月に発生した、危険ドラッグ使用者が引き起こした暴走事故のような悲惨な事故も次々と明らかになった。

この危機的状況を受けて、平成 25 年 10 月

薬事法改正により麻薬取締官・麻薬取締員に指定薬物の取り締まり権限が与えられた。次いで、平成 26 年 4 月の薬事法改正により指定薬物の所持・使用が禁止された。さらに 7 月に「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を改正し、知事指定薬物の所持・使用を禁止した。このような規制強化により、平成 26 年 7 月に 68 店舗あった危険ドラッグを扱う店舗は平成 27 年 1 月には 3 店舗に激減している²⁾。

その一方で、製品中から指定薬物を検出する事例が増加し、新規未規制薬物も次々と発見されている。薬物乱用を防止するために、新たに発見された薬物を迅速に同定し、法律・条例等により監視強化を図っていく必要がある。

東京都健康安全研究センター医薬品研究科

では、薬物乱用防止を目的として平成8年度より福祉保健局健康安全部と共同で危険ドラッグの流通実態調査を行っている。当研究科では試験検査を担当するとともに、新規未規制薬物の分析法の開発に取り組んでいる。本報では、平成26年度に行った危険ドラッグ218製品のうち201製品の試験結果及び新規検出薬物29種について報告する。

B. 研究方法

1. 試料

平成26年4月～平成27年3月に当センターに搬入された218製品を試料とした。なお、これらは都内の危険ドラッグ販売店、あるいはインターネットを通じ購入されたもので、それらの性状と製品数は、液体54製品、粉末37製品、植物片（脱法ハーブと称するもの）110製品であった。

2. 標準品

市販標準品は主に Cayman Chemical, Inc.製を使用し、和光純薬工業（株）製、（株）ワコーケミカル製、東京化成工業（株）製、Sigma-Aldrich, Inc.製、Alfa Aesar, Inc.製も合わせて使用した。その他入手が困難なものは、筆者らが製品から単離精製し構造決定したもの、または化学合成したものを使用した。

3. 試薬

クロロホルム- d_1 、メタノール- d_4 、ベンゼン- d_6 、ジメチルスルホキシド- d_6 は Cambridge Isotope Laboratories, Inc.製及び和光純薬工業（株）製を使用した。

水は超純水製造装置 Milli-Q gradient A-10（日本ミリポア（株）製）で製造した比抵抗値 $18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の超純水を使用した。

その他の試薬は HPLC 用及び特級を使用した。

C. 研究結果及び考察

平成26年度に調査が終了した201製品のうち148製品から薬物を検出し、42種の薬物を検出した。うち、新規薬物は29種であった。また、42製品からは2種以上の薬物が検出された。

検出された規制薬物の構造式を図1に示した。24製品から麻薬2種類、指定薬物を8種類、延べ29薬物を検出した。これらはすべて行政処分が行われ、規制薬物含有の製品は市場から排除された³⁻⁶⁾。

検出された新規検出薬物29種の構造式を図2～5に示した。内訳はフェネチルアミン誘導体3種（図2）、カチノン誘導体15種（図3）、合成カンナビノイド9種（図4）、その他2種であった（図5）。フェネチルアミン誘導体は、麻薬や指定薬物を *N*-*o*-メトキシフェニル誘導体及び *N*-*o*-フルオロフェニル誘導体とした薬物の流通が認められた。カチノン誘導体は、平成26年1月に施行された包括規制により規制された薬物の置換基を変更し、炭素鎖を延長した薬物及びフェニル基の置換基の数を増やした薬物の流通が認められた。また、平成25年3月にいち早く包括規制が施行された合成カンナビノイドについても、カルボニル結合をエステル結合・アミド結合へと置換した薬物が多く流通していることが確認された。合わせてインドール骨格をインダゾール骨格へと置換した薬物、カルボニル結合をエステル結合へと置換した薬物、ナフタレン骨格をキノリン、エステル、カルボキサミドへと置換した薬物、インドール骨格の1位の窒素に結合した *n*-アルキル基をフルオロアルキル基、フルオロベンジル基、シクロヘキシルメチル基へと置換した薬物の流通が認められた。その他の薬物として、NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤の 2-MeO-ジフェニジンや麻薬フェンタニルの *N*-アセチル誘導体であるアセチルフェンタニルの流通が認められた。

検出後これらすべての薬物は、東京都知事指定薬物や薬事法指定薬物に速やかに指定された。

D. 結論

平成26年度に調査が終了した201製品のうち148製品から総計で42種の薬物が検出された。また、42製品からは2種以上の薬物が検出された。

指定薬物は24製品から計10種が検出された。

新規検出薬物は29種であった。平成25年3月に合成カンナビノイド、平成26年1月にカチノン誘導体の一部に包括規制が導入されたが、指定後には置換基の炭素鎖の延長やカルボニル結合をアミド結合やエステル結合に変化させたものなど、包括規制からはずれる新たな薬物の流通が認められた。

E. 参考文献

- 1) http://www.keishicho.metro.tokyo.jp/kenken_drug/kenken_drug_top.htm
- 2) http://www.keishicho.metro.tokyo.jp/kenken_drug/kenken_drug_top.htm
- 3) <http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2014/07/20o7f300.htm>
- 4) <http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2014/07/20o7n100.htm>
- 5) <http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2015/02/20p2c400.htm>
- 6) <http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2015/03/20p36400.htm>

F. 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)naphthylamine (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)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, 市川瑤子, 高橋美佐子, 植村望美, 清水聖子, 長嶋真知子, 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

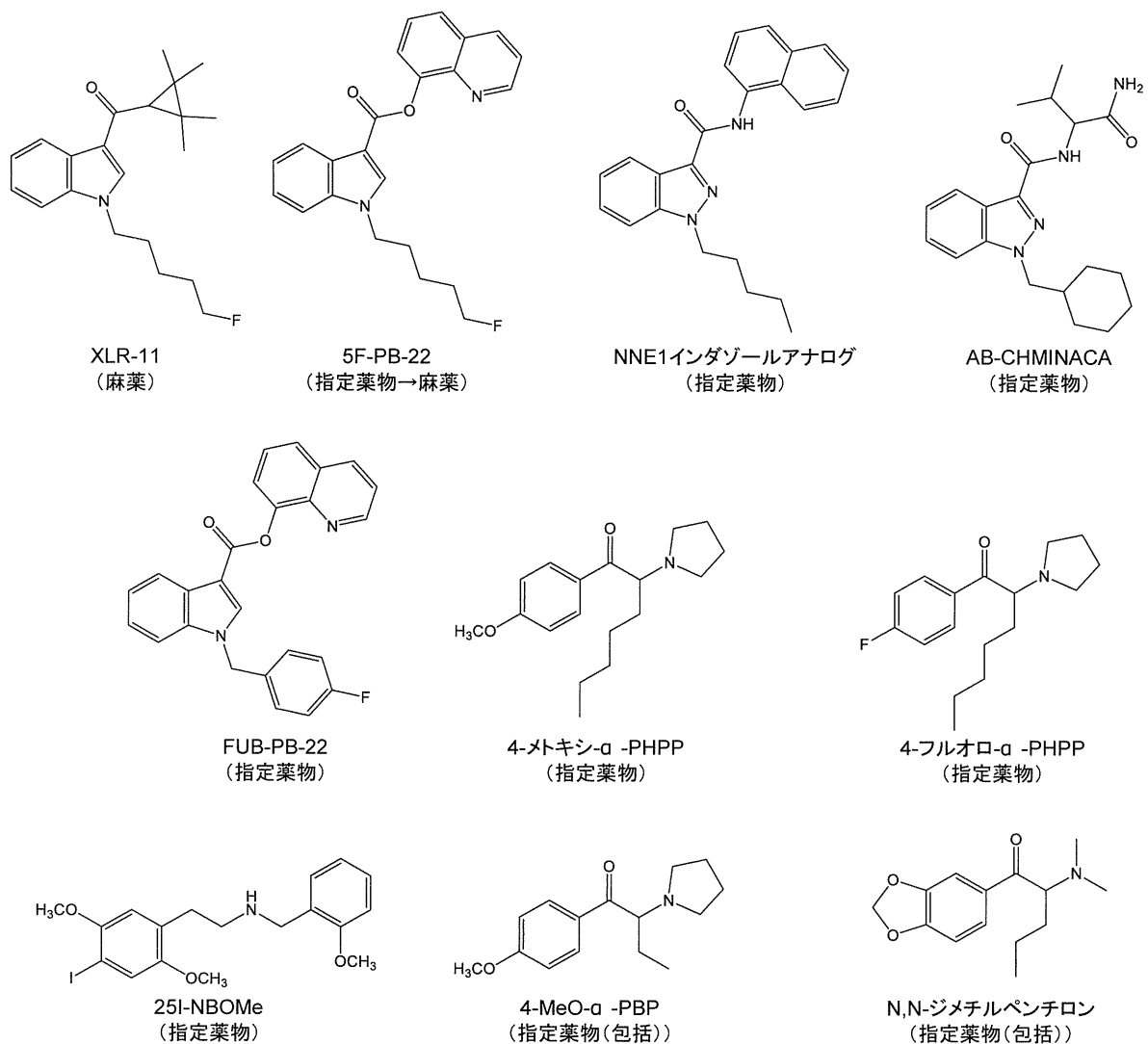


図 1. 平成 26 年度に東京都で検出した規制薬物

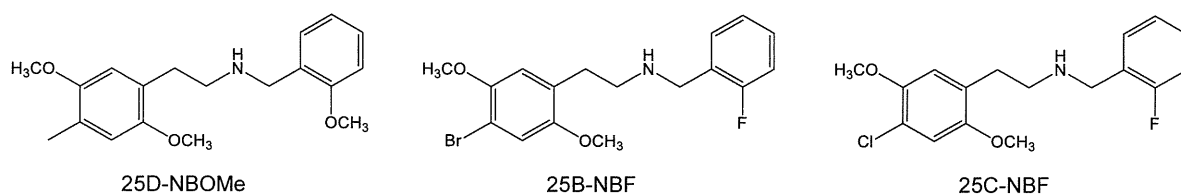


図 2. 平成 26 年度新規検出薬物 (フェネチルアミン誘導体)

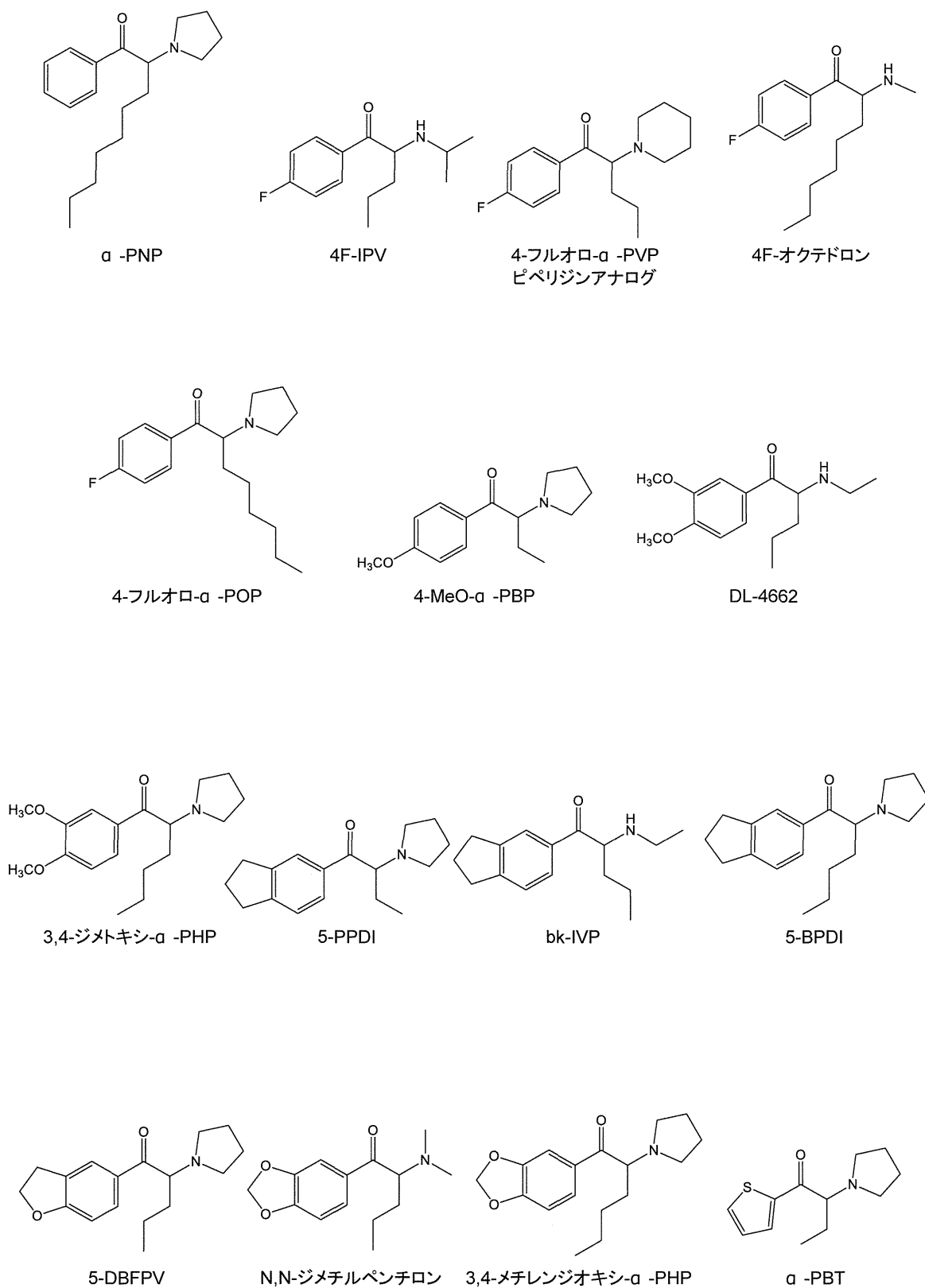


図 3. 平成 26 年度新規検出薬物（カチノン誘導体）