

One-step AMP

各試料溶液(110 µL)を各キットのサンプルウェルに滴下し、試料を浸透させる。試料はメンブレン上を浸透・移動し、滴下 3 分後における判定ラインを目視判定すると共に、撮影条件を統一したデジタルカメラで判定結果の写真撮影を行った。コントロールライン(C)にバンドが現れ、且つ、テストライン(T)にバンドが現れない場合を陽性と判定する。両バンドが現れる場合は、陰性と判定する。目視でテストラインに僅かでもバンドが確認できるものについても陰性と判定する。コントロールライン(C)にバンドが現れないものについては無効とする。

INSTANT-VIEW® MDMA&METH&

各試料溶液(500 µL)をキットのサンプルウェルに滴下し、試料を浸透させる。試料はメンブレン上を浸透・移動し、滴下 7 分後における判定ラインを目視判定すると共に、撮影条件を統一したデジタルカメラで判定結果の写真撮影を行った。メタンフェタミン、アンフェタミン、MDMA の各種試験の判定は個別に行い、コントロールライン(C)にバンドが現れ、且つ、テストライン(T)にバンドが現れない場合を陽性と判定する。両バンドが現れる場合は、陰性と判定する。目視でテストライン(T)に僅かでもバンドが確認できるものについても陰性と判定する。コントロールライン(C)にバンドが現れないものについては無効とする。

4. 交差反応

尿中薬物濃度を 0.3-100 µg/mL (0.3, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL)に調製した試料溶液及びブランク尿を用いて、AccuSign®及び INSTANT-VIEW®の各キットで試験を実施し、陽性を示した最低濃度を最低検出濃度とした。なお、AccuSign®キットについては最低検出濃度が判明した場合は、その濃度よりも高濃度での検討は行わなかった。また、高濃度(100 µg/mL)で陰性であったものは、より低濃度での検討は行わなかった。

各キットの交差反応は Maria Nieddu らによる算出方法³⁾に従って、(1)に示す式により、メーカー発表値である各試験の検出限界濃度(cutoff値)を分子(y)とし、各試料溶液で偽陽性を示した最低検出濃度を分母(x)として、yをxで除した百分率で表した。

AccuSign® One-step MET 及び AccuSign® One-step AMP キットのメーカー発表の検出限界濃度(cutoff値)は、1 µg/mL であり、INSTANT-VIEW® MDMA&METH& キットにおけるメーカー発表の MDMA、メタンフェタミン、アンフェタミンの検出限界濃度(cutoff値)は、それぞれ、0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.3 µg/mL である。

$$\text{公差反応(\%)} = \frac{y}{x} \times 100 \quad (1)$$

5. 各キットの評価方法

本研究に用いた AccuSign®及び INSTANT-VIEW®キットにおいて、メタンフェタミンを除いた 24 化合物について、以下に示す手順に従って、各試験結果を考慮の上、尿中覚醒剤陽性と総合判定した。

【AccuSign®キットの尿中覚醒剤陽性の判定手順】

① AccuSign® One-step MET キットで偽陽性を示した化合物を選定する。

② AccuSign® One-step MET キットで偽陽性を示した化合物の検出濃度を分析し、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物にあっては、覚醒剤及び MDMA 乱用者における尿中の未変化体及び代謝物の濃度比を参考に検出濃度の 1/2 の濃度、第 2 級アミン構造を有する MDMA 類似薬物にあっては、検出濃度の 1/5 の濃度における各代謝物と考えられる N-脱アルキル体(第 1 級アミン)の AccuSign® One-step AMP キット(アンフェタミン試験)の判定結果を分析する。

③ ②の AccuSign® One-step AMP キット(アンフェタミン試験)で偽陽性を示した化合物について、尿中覚醒剤陽性と総合判定する。

【INSTANT-VIEW[®]キットの尿中覚醒剤陽性の判定手順】

- ① INSTANT-VIEW[®]キットのメタンフェタミン試験において偽陽性を示した化合物を選定する。
- ② INSTANT-VIEW[®]キットのメタンフェタミン試験において偽陽性を示した化合物の検出濃度における INSTANT-VIEW[®]キットの MDMA 試験結果を分析し、MDMA 試験も偽陽性を示した化合物は、尿中覚醒剤陰性と総合判定する。
- ③ INSTANT-VIEW[®]キットのメタンフェタミン試験において偽陽性を示し、且つ、INSTANT-VIEW[®]キットの MDMA 試験で陰性を示した化合物の検出濃度を分析し、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物にあつては、前同様に覚醒剤及び MDMA 乱用者における尿中の未変化体及び代謝物の濃度比を参考に検出濃度の 1/2 の濃度、第 2 級アミン構造を有する MDMA 類似薬物にあつては、検出濃度の 1/5 の濃度における各代謝物と考えられる *N*-脱アルキル体(第 1 級アミン)のアンフェタミン試験の判定結果を分析する。
- ④ ③の INSTANT-VIEW[®]キットのアンフェタミン試験で偽陽性を示した化合物について、尿中覚醒剤陽性と総合判定する。

C. 研究結果

1. AccuSign[®] One-step MET 及び AccuSign[®] One-step AMP キットの各試験結果

AccuSign[®] One-step MET 及び AccuSign[®] One-step AMP キットを用いて試験した 24 化合物及び *d*-Methamphetamine の試験結果を Table 1 に示す。メタンフェタミン試験に偽陽性を示した化合物は、24 化合物中 17 化合物であり、その内訳は、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物が 5 化合物(最低検出濃度 1-100 µg/mL)、第 2 級アミン構造を有する MDMA 類似薬物が 7 化合物(最低検出濃度 5-50 µg/mL)、第 1 級アミン構造を有するアンフェタミン及び MDA 類似薬物が 5 化合物(最低検出濃度 100 µg/mL)であった。第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン及び

MDMA 類似薬物 12 化合物は、主に試験濃度 5 µg/mL 以上になると偽陽性を示す傾向が見られた。偽陽性を示した各物質の最低検出濃度から交差反応を算出した結果を Table 3 に示す。

メタンフェタミン試験において偽陽性を示した第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン及び MDMA 類似薬物 12 化合物の *N*-脱アルキル体(第 1 級アミン)12 化合物(重複化合物含む.)は、アンフェタミン試験の試験濃度 5 µg/mL 以上で全て偽陽性を示した。(Table 1 参照)尿中覚醒剤陽性の判定手順に従って、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物 5 化合物にあつては、尿中薬物濃度 10 µg/mL 又は 25 µg/mL 以上、第 2 級アミン構造を有する MDMA 類似薬物 7 化合物にあつては、尿中薬物濃度 25 µg/mL 以上で AccuSign[®]のメタンフェタミン試験及びアンフェタミン試験が共に偽陽性を示すと考えられた。従って、Fig. 5 に示す第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン及び MDMA 類似薬物 12 化合物を使用した場合、化合物の尿中濃度によってはその代謝物と考えられる第 1 級アミンも尿中から検出され、アンフェタミン試験で偽陽性を示し、尿中覚醒剤陽性と総合判定される結果であった。(Table 5 参照)

2. INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH& キットの各試験結果

INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH& キットを用いて試験した 24 化合物及び *d*-Methamphetamine の試験結果を Table 2 に示す。メタンフェタミン試験に偽陽性を示した化合物は 24 化合物中 11 化合物であり、その内訳は、*d*-Amphetamine(最低検出濃度 100 µg/mL)のほか、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物が 3 化合物(最低検出濃度 10-50 µg/mL)、第 2 級アミン構造を有する MDMA 類似薬物が 7 化合物(最低検出濃度 10-25 µg/mL)であった。偽陽性を示した各物質の最低検出濃度から交差反応を算出した結果を Table 4 に示す。

メタンフェタミン試験で偽陽性を示した *d*-Amphetamine を除いた 10 化合物を Fig. 6 に示す。これら 10 化合物は、主に試験濃度 10 µg/mL 以上で偽陽性を示す傾向が見られた。(Table 6 参照)

これら 10 化合物の中で 8 化合物はメタンフェタミン試験で偽陽性を示した最低検出濃度で MDMA 試験も偽陽性(最低検出濃度 0.3-10 µg/mL)を示したことから、尿中覚醒剤陰性と総合判定した。残りの 2 化合物(4-FMA, 6-MAPB)は、MDMA 試験の試験濃度 50 µg/mL 以上で偽陽性を示し、試験濃度 25 µg/mL 以下では陰性を示した。

この 2 化合物(4-FMA, 6-MAPB)の *N*-脱アルキル体(第 1 級アミン) 2 化合物(4-Fluoroamphetamine, 6-APB)は、アンフェタミン試験の試験濃度 1 µg/mL 以上で 4-Fluoroamphetamine, 0.3 µg/mL 以上で 6-APB が偽陽性を示した。

尿中覚醒剤陽性の判定手順に従って、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物である 4-FMA にあつては、尿中薬物濃度が 10-25 µg/mL の濃度範囲、第 2 級アミン構造を有する MDMA 類似薬物である 6-MAPB にあつては、尿中薬物濃度 10-25 µg/mL の濃度範囲で INSTANT-VIEW® のメタンフェタミン試験及びアンフェタミン試験が共に偽陽性を示し、且つ、MDMA 試験が陰性を示した。従って、Fig. 6 に示す 4-FMA 及び 6-MAPB(第 2 級アミン)を使用した場合、その代謝物と考えられる 4-Fluoroamphetamine 及び 6-APB(第 1 級アミン)も尿中から検出され、アンフェタミン試験で偽陽性を示し、尿中覚醒剤陽性と総合判定される結果であった。(Table 6 参照)

D. 考察

第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン及び MDMA は、ヒト生体内においてアンフェタミン及び MDA に代謝され尿中から検出される。第 2 級

アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物のアミノ基にエチル基が結合した化合物(EAPB)についても、ヒト尿中資料において、代謝物と考えられる *N*-脱アルキル体(APB)が検出されることが報告⁴⁾されていることから、第 2 級アミン構造を有するメタンフェタミン類似薬物等にあつても同様にヒト生体内において代謝され、*N*-脱アルキル化された第 1 級アミンが尿中から検出されると考えられる。

メタンフェタミン及び MDMA の代謝物の尿中濃度については、大阪府科捜研志摩らの研究により、尿中のメタンフェタミンとアンフェタミンの濃度比から、メタンフェタミン 1.00 に対してアンフェタミンを 0.009-0.54 と定量している。^{5,6)} また、MDMA と MDA の尿中の濃度比から、MDMA 1.00 に対して、MDA を 0.022-0.21 と定量している。^{5,6)} イムノクロマトグラフィーによる交差反応では、主要な代謝物を含む代謝物群の濃度が判定に影響を与えると考えられるが、アンフェタミン以外の代謝物群による影響は未変化体の 1%以下、MDA 以外の代謝物群による影響は未変化体の 2%以下との報告⁷⁾もあり、主要な代謝物以外の代謝物群による影響は少ないと考えられる。従って、本研究では試験した化合物の生体内主代謝物と考えられる *N*-脱アルキル体(第 1 級アミン)のアンフェタミン試験の試験濃度は、メタンフェタミン類似薬物にあつてはメタンフェタミン試験の試料濃度の 1/2 の濃度、MDMA 類似薬物にあつてはメタンフェタミン試験の試料濃度の 1/5 の濃度における偽陽性の有無を分析した。

INSTANT-VIEW® キットで尿中覚醒剤陽性と総合判定する化合物数が AccuSign® キットよりも少なかったのは、試験した 24 化合物中 18 化合物が MDMA 試験に偽陽性を示したことにより、INSTANT-VIEW® キットでは尿中覚醒剤陰性と総合判定されたことによる。

INSTANT-VIEW® キットの MDMA 試験は、高濃度(100 µg/mL)のメタンフェタミンでも偽陽性を示さなかったことから、同キットの MDMA 試験で偽陽性を示す化合物は主に MDMA の構造に類

似したメチレンジオキシ基やベンゾフラン骨格等を有する化合物であった。

従って、INSTANT-VIEW[®] キットの MDMA 試験を実施することにより、MDMA 試験に偽陽性を示す化合物を排除することができることは、現場において尿中覚醒剤陽性と誤判定する可能性を下げることに繋がり、INSTANT-VIEW[®] キットは AccuSign[®] キットよりも誤判定を生じる可能性が少ないキットであると言える。

E. 結論

覚醒剤捜査における尿中覚醒剤現場簡易試験として、AccuSign[®] One-step MET 及び AMP と INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH& の 2 種類のキットを用いて偽陽性が生じる濃度等について検討した結果、AccuSign[®] キットは 24 化合物中 12 化合物に偽陽性を示し、INSTANT-VIEW[®] キットは 24 化合物中 2 化合物に偽陽性を示す結果であった。どちらのキットも少なからず、メタンフェタミン等類似薬物に対して偽陽性を示す化合物が存在することから、現場簡易試験としては充分ではないものの、INSTANT-VIEW[®] キットは、MDMA 試験を実施することにより、メタンフェタミンとそれ以外の MDMA 等類似薬物を区別することができる可能性が示され、現場簡易試験としては AccuSign[®] のキットよりも INSTANT-VIEW[®] キットの方が尿中覚醒剤陽性と誤判定するリスクを下げることに繋がると考えられる。

F. 参考文献

1. 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志, 簡易薬物スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分の識別法の検討, 日本法中毒学会第34年会, 福岡(2015.6)
2. 石丸(飯尾)麗子, 岩室嘉晃, 地中啓, 高山成明, 早川和一, *d* 体メタンフェタミン乱用者尿中濃度と摂取状況, 法科学技術, 18(2), 155-166(2013)
3. Maria, N., Lucia, B., Claudia, T., Gianpiero, B.,

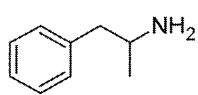
Forensic Toxicol.32:132-138(2014)

4. Victor, U., Mike, A., Sumandeep, R., Stewart, M., and Wayne, R., Journal of Analytical Toxicology, 38:106-109 (2014)
5. N. Shima, H.T. Kamata, M. Katagi, H. Tsuchihashi, Xenobiotica 36, 259-267 (2006)
6. N. Shima, M. Katagi, H. Kamata, K. Zaitso, T. Kamata, M. Nishikawa, A. Miki, H. Tsuchihashi, T.Skakuma, N. Nemoto, Xenobiotica 38, 314-324 (2008)
7. Keiko, N., Akihiro, M., Kei, Z., Hirose, K., Noriaki, S., Tooru, K., Munehiro, K., Michiaki, T., Hitoshi, T., Koichi, S., Forensic Science International, 217, 174-181 (2012)

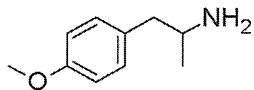
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

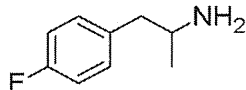
H. 知的所有権の取得状況
特になし。



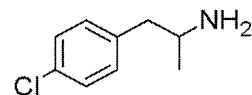
d-Amphetamine



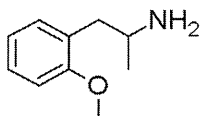
PMA



4-Fluoroamphetamine

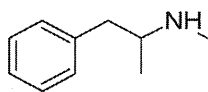


4-Chloroamphetamine

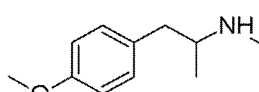


2-Methoxyamphetamine

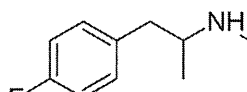
Fig. 1 Structure of tested Amphetamine analogs (Primary amines)



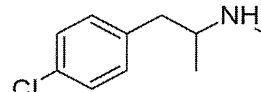
d-Methamphetamine



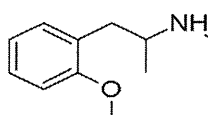
PMMA



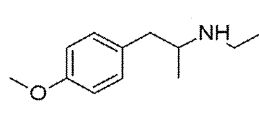
4-Fluoromethamphetamine



4-Chloromethamphetamine

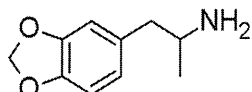


2-Methoxymethamphetamine

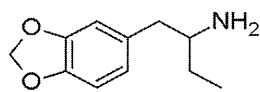


PMEA

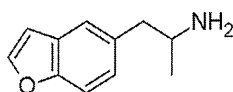
Fig. 2 Structure of tested Methamphetamine analogs (Secondary amines)



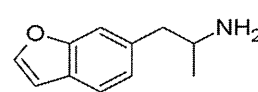
MDA



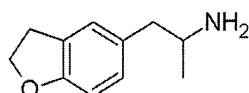
BDB



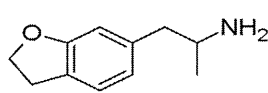
5-APB



6-APB

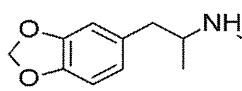


5-APDB

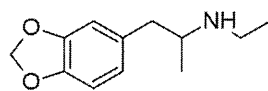


6-APDB

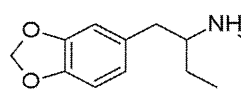
Fig. 3 Structure of tested MDA analogs (Primary amines)



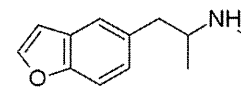
MDMA



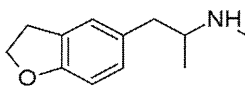
MDEA



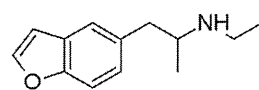
MBDB



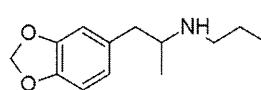
5-MAPB



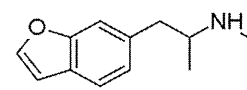
5-MAPDB



5-EAPB



3,4-MDPA



6-MAPB

Fig. 4 Structure of tested MDMA analogs (Secondary amines)

Table 1 Minimum concentrations of drugs that gave positive results in human urine (AccuSign® AMP/MET)

	Minimum concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	
	AMP	MET
<i>Amphetamine analogs (Primary amines)</i>		
<i>d</i> -Amphetamine	5	>100
<i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	5	100
4-Fluoroamphetamine	5	>100
4-Chloroamphetamine	5	>100
2-Methoxyamphetamine	5	>100
<i>Methamphetamine analogs (Secondary amines)</i>		
<i>d</i> -Methamphetamine	>100	1
<i>p</i> -Methoxymethamphetamine (PMMA)	>100	1
4-Fluoromethamphetamine (4-FMA)	>100	5
<i>N</i> -ethyl-4-Methoxyamphetamine (PMEA)	>100	25
4-Chloromethamphetamine	>100	5
2-Methoxymethamphetamine	>100	100
<i>MDA analogs (Primary amines)</i>		
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	5	100
2-Amino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (BDB)	5	>100
5-APB	5	100
6-APB	5	100
5-APDB	5	>100
6-APDB	5	100
<i>MDMA analogs (Secondary amines)</i>		
3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)	100	5
3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	>100	50
2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-butane (MBDB)	>100	5
5-MAPB	100	5
5-MAPDB	100	5
5-EAPB	>100	50
3,4-MDPA	>100	>100
6-MAPB	100	5

Table 2 Minimum concentrations of drugs that gave positive results in human urine (INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH&)

	Minimum concentration (µg/mL)		
	AMP	MET	MDMA
<i>Amphetamine analogs (Primary amines)</i>			
<i>d</i> -Amphetamine	0.3	100	>100
<i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	0.3	>100	50
4-Fluoroamphetamine	1	>100	100
4-Chloroamphetamine	1	>100	>100
2-Methoxyamphetamine	1	>100	>100
<i>Methamphetamine analogs (Secondary amines)</i>			
<i>d</i> -Methamphetamine	>100	0.5	>100
<i>p</i> -Methoxymethamphetamine (PMMA)	100	50	5
4-Fluoromethamphetamine (4-FMA)	>100	10	50
<i>N</i> -ethyl-4-Methoxyamphetamine (PMEA)	>100	50	5
4-Chloromethamphetamine	>100	>100	50
2-Methoxymethamphetamine	>100	>100	>100
<i>MDA analogs (Primary amines)</i>			
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	0.3	>100	5
2-Amino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (BDB)	0.3	>100	>100
5-APB	0.3	>100	50
6-APB	0.3	>100	>100
5-APDB	0.3	>100	25
6-APDB	0.3	>100	100
<i>MDMA analogs (Secondary amines)</i>			
3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	100	10	0.5
3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	>100	10	0.3
2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-butane (MBDB)	>100	25	5
5-MAPB	100	25	10
5-MAPDB	100	>100	5
5-EAPB	>100	25	5
3,4-MDPA	>100	10	0.3
6-MAPB	100	10	50

Table 3 Cross-reactivities of each drug in human urine (AccuSign® AMP/MET)

	Cross-reactivities (%)	
	AMP (cutoff: 1.0 µg/mL)	MET (cutoff: 1.0 µg/mL)
<i>Amphetamine analogs (Primary amines)</i>		
<i>d</i> -Amphetamine	20	<1
<i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	20	1
4-Fluoroamphetamine	20	<1
4-Chloroamphetamine	20	<1
2-Methoxyamphetamine	20	<1
<i>Methamphetamine analogs (Secondary amines)</i>		
<i>d</i> -Methamphetamine	<1	100
<i>p</i> -Methoxymethamphetamine (PMMA)	<1	100
4-Fluoromethamphetamine (4-FMA)	<1	20
<i>N</i> -ethyl-4-Methoxyamphetamine (PMEA)	<1	4
4-Chloromethamphetamine	<1	20
2-Methoxymethamphetamine	<1	1
<i>MDA analogs (Primary amines)</i>		
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	20	1
2-Amino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (BDB)	20	<1
5-APB	20	1
6-APB	20	1
5-APDB	20	<1
6-APDB	20	2
<i>MDMA analogs (Secondary amines)</i>		
3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	1	20
3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	<1	2
2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-butane (MBDB)	<1	20
5-MAPB	1	20
5-MAPDB	1	20
5-EAPB	<1	2
3,4-MDPA	<1	<1
6-MAPB	1	20

Table 4 Cross-reactivities of each drug in human urine (INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH&)

	Cross-reactivities (%)		
	AMP (cutoff: 0.3 µg/mL)	MET (cutoff: 1.0 µg/mL)	MDMA (cutoff: 0.5 µg/mL)
<i>Amphetamine analogs (Primary amines)</i>			
<i>d</i> -Amphetamine	100	1	<0.5
<i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	100	<1	1
4-Fluoroamphetamine	30	<1	0.5
4-Chloroamphetamine	30	<1	<0.5
2-Methoxyamphetamine	30	<1	<0.5
<i>Methamphetamine analogs (Secondary amines)</i>			
<i>d</i> -Methamphetamine	<0.3	200	<0.5
<i>p</i> -Methoxymethamphetamine (PMMA)	<0.3	2	10
4-Fluoromethamphetamine (4-FMA)	<0.3	10	1
<i>N</i> -ethyl-4-Methoxyamphetamine (PMEA)	<0.3	2	10
4-Chloromethamphetamine	<0.3	<1	1
2-Methoxymethamphetamine	<0.3	<1	<0.5
<i>MDA analogs (Primary amines)</i>			
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	100	<1	10
2-Amino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (BDB)	100	<1	<0.5
5-APB	100	<1	1
6-APB	100	<1	<0.5
5-APDB	100	<1	2
6-APDB	100	<1	0.5
<i>MDMA analogs (Secondary amines)</i>			
3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA)	0.3	10	100
3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	<0.3	10	166.7
2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-butane (MBDB)	<0.3	4	10
5-MAPB	0.3	4	5
5-MAPDB	0.3	<1	10
5-EAPB	<0.3	4	10
3,4-MDPA	<0.3	10	166.7
6-MAPB	0.3	10	1

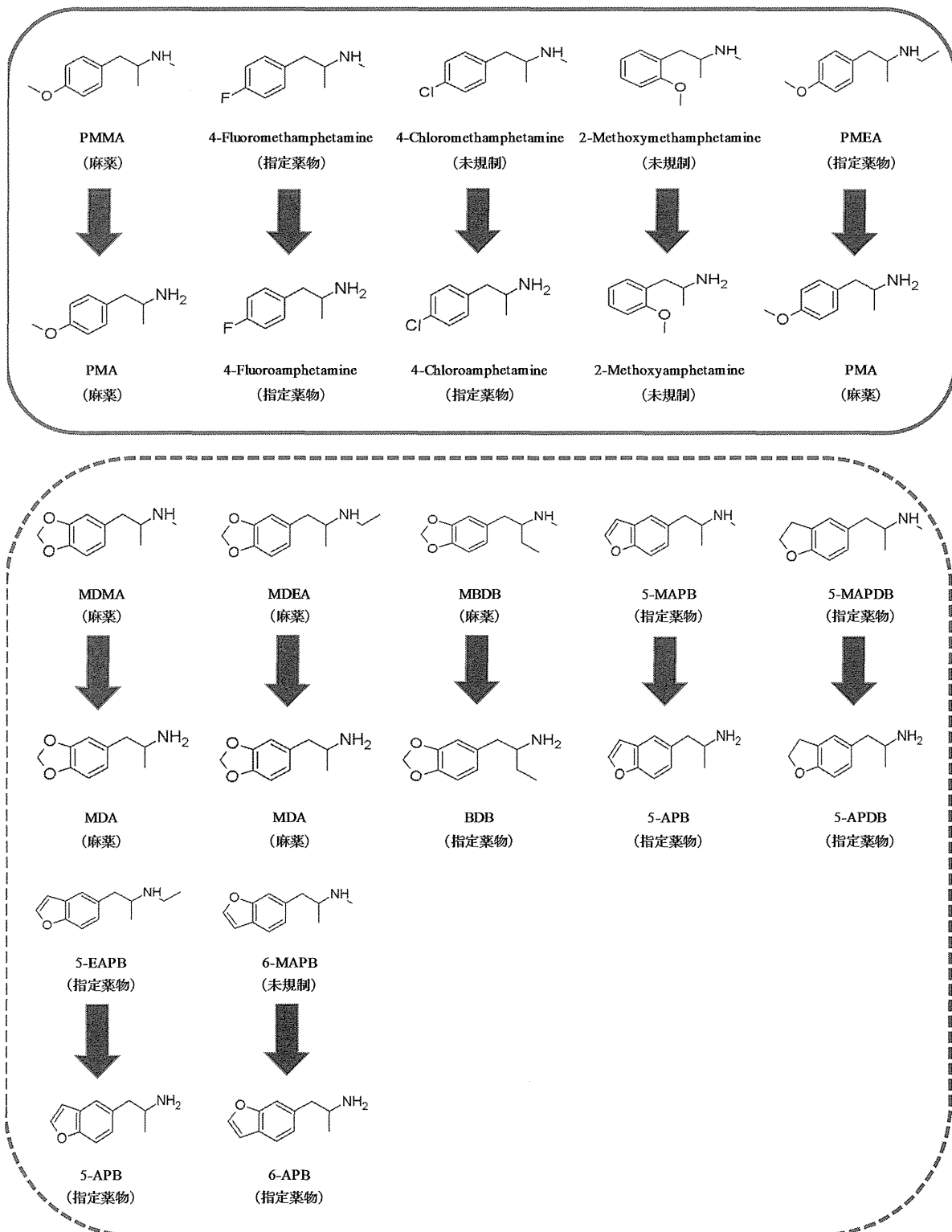




Fig. 5 Secondary amines and corresponding *N*-dealkylated amines that gave possible false positive results with AccuSign[®] AMT/MET

 メタンフェタミン類似薬物(第2級アミン)で尿中薬物濃度が 10 μ g/mL以上 (PMEAsのみ尿中薬物濃度25 μ g/mL以上)の場合、それらの代謝物と考えられる*N*-脱アルキル体(第1級アミン)もAccuSign[®]のアンフェタミン試験に偽陽性を示す可能性がある。

 MDMA類似薬物(第2級アミン)で尿中薬物濃度が 25 μ g/mL以上の場合、それらの代謝物と考えられる*N*-脱アルキル体(第1級アミン)もAccuSign[®]のアンフェタミン試験に偽陽性を示す可能性がある。

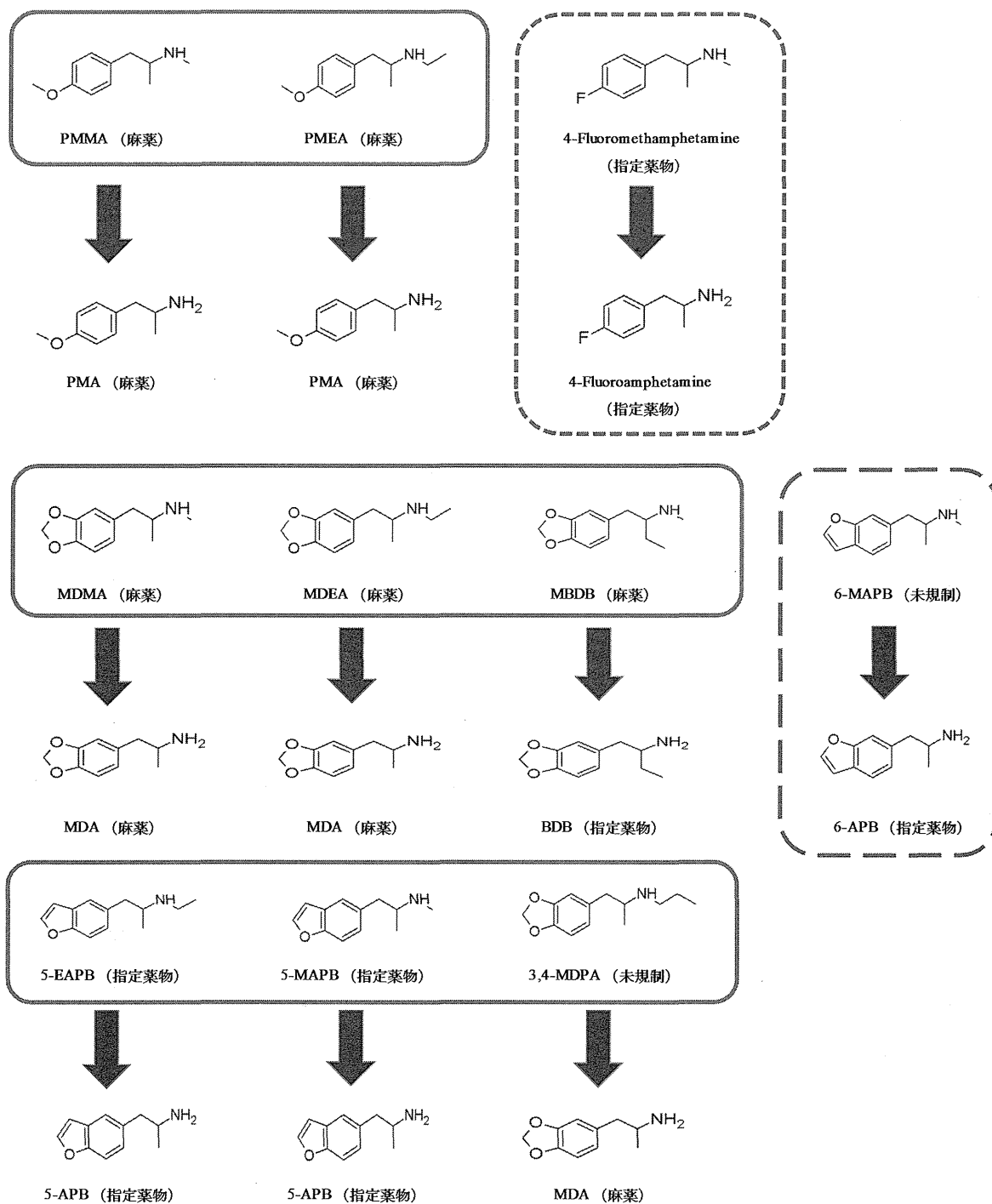


Fig. 6 Secondary amines and corresponding *N*-dealkylated amines that gave possible false positive results with INSTANT-VIEW[®] METH&

 4-Fluoromethamphetamine (第2級アミン) の尿中薬物濃度が 10-25 $\mu\text{g/mL}$ の場合、代謝物と考えられる4-Fluoroamphetamine (第1級アミン) もINSTANT-VIEW[®] のアンフェタミン試験に偽陽性を示す可能性がある。

 6-MAPB (第2級アミン) の尿中薬物濃度が 10-25 $\mu\text{g/mL}$ の場合、代謝物と考えられる6-APB (第1級アミン) もINSTANT-VIEW[®] のアンフェタミン試験に偽陽性を示す可能性がある。

 INSTANT-VIEW[®] のメタンフェタミン試験において偽陽性を示した濃度において、MDMA試験も偽陽性を示したため、INSTANT-VIEW[®] キットの総合判定で尿中覚醒剤陰性となり除外した化合物

Table 5 Secondary amines and corresponding *N*-dealkylated amines that gave possible false decision in human urine with AccuSign[®] AMP/MET

Analyte	kit type	decision	Urinary concentration ^{a)} (µg/mL)							
			0.3	0.5	1	5	10	25	50	100
A <i>p</i> -Methoxymethamphetamine (PMMA)	MET	+								
	AMP									
B <i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	MET									
	AMP									
A 4-Fluoromethamphetamine (4-FMA)	MET	+								
	AMP									
B 4-Fluoroamphetamine	MET									
	AMP									
A 4-Chloromethamphetamine	MET	+								
	AMP									
B 4-Chloroamphetamine	MET									
	AMP									
A 2-Methoxymethamphetamine	MET	+								
	AMP									
B 2-Methoxyamphetamine	MET									
	AMP									
A <i>N</i> -ethyl-4-Methoxyamphetamine (PMEA)	MET	+								
	AMP									
B <i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	MET									
	AMP									
A 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	MET	+								
	AMP									
B 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	MET									
	AMP									
A 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	MET	+								
	AMP									
B 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	MET									
	AMP									
A 2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-butane (MBDB)	MET	+								
	AMP									
B 2-Amino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (BDB)	MET									
	AMP									
A 5-MAPB	MET	+								
	AMP									
B 5-APB	MET									
	AMP									
A 5-MAPDB	MET	+								
	AMP									
B 5-APDB	MET									
	AMP									
A 5-EAPB	MET	+								
	AMP									
B 5-APB	MET									
	AMP									
A 6-MAPB	MET	+								
	AMP									
B 6-APB	MET									
	AMP									

a Urinary concentration that gave false positive results with AccuSign[®] AMP/MET. (Gray color indicates the range of urinary concentration that gave false positive results.)

A indicates secondary amines.

B indicates *N*-dealkylated amines of A.

Table 6 Secondary amines and corresponding *N*-dealkylated amines that gave false positive results in human urine with INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH&

	Analyte	kit type	decision	Urinary concentration ^a (µg/mL)							
				0.3	0.5	1	5	10	25	50	100
A	<i>p</i> -Methoxymethamphetamine (PMMA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	<i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	4-Fluoromethamphetamine (4-FMA)	METH	+								
		AMP									
		MDMA									
B	4-Fluoroamphetamine	METH	+								
		AMP									
		MDMA									
A	<i>N</i> -ethyl-4-Methoxyamphetamine (PMEA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	<i>p</i> -Methoxyamphetamine (PMA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-butane (MBDB)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	2-Amino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butane (BDB)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	3,4-MDPA	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	5-EAPB	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	5-APB	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	5-MAPB	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
B	5-APB	METH	-								
		AMP									
		MDMA									
A	6-MAPB	METH	+								
		AMP									
		MDMA									
B	6-APB	METH	+								
		AMP									
		MDMA									

a Urinary concentration that gave false positive results with INSTANT-VIEW[®] MDMA&METH&. (Gray color indicates the range of urinary concentration that gave false positive results.)

A indicates secondary amines.

B indicates *N*-dealkylated amines of A.

分担研究課題: コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究

研究分担者: 出水 庸介 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部第二室 室長

—コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究(3)—

研究要旨: 乱用が懸念される違法ドラッグ(合成カンナビノイドなど)を迅速に規制するためには, その有害性を把握し評価することが重要である. 本研究では, コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの作用する CB1 受容体の立体構造構築と化合物との相互作用, および化合物の代謝予測を行うことを目的とした. 本年度は, CB1 受容体のホモロジーモデリングに用いる GPCR テンプレートの検討, CB1 受容体と相同性の高い S1P 受容体(PDB:3V2Y)およびアドレナリン β 2 受容体(PDB:4QKX)をそれぞれテンプレートとした CB1 受容体の立体構造の構築, および様々な CB1 リガンド(69 種類)のドッキングシミュレーションをおこなった.

A. 研究目的

近年, カンナビノイド受容体(CB1 受容体)に強い活性を示す合成カンナビノイド含有製品(違法ドラッグ, 脱法ハーブ)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. 乱用が懸念される違法ドラッグを迅速に規制するためには, その有害性を把握し評価することが重要である. しかしながら, 規制化に伴い, 従来流通していた化合物にはない新しいタイプの構造を有する活性未知の化合物が次々と出現し, 分析鑑定現場を混乱させている. 本研究では, これらの製品から単離・同定される新規カンナビノイド化合物と CB1 受容体との結合様式をコンピュータモデリングにより予測し, さらにそれらの化合物代謝構造を予測することで, 違法薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的とした. 前年度までに, GPCR のひとつであるロドプシン(PDB:1F88)をテンプレートとして¹⁾, ホモロジーモデリングによるCB1受容体の立体構造構築と, CB1 リガンドの受容体に対する結合エネルギーと活性の相関関係評価を行ったが, 顕著な

相関を見出すには至っていない. そこで今年度は, ホモロジーモデリングに用いるGPCRテンプレートの探索, CB1 受容体の立体構造再構築, CB1 リガンドとのドッキングシミュレーションをおこなうことでリガンドの安定配座を探索し, CB1 受容体に対する結合エネルギーと活性の相関関係評価をおこなった.

B. 研究方法

1. GPCR テンプレートの探索および CB1 受容体のホモロジーモデリング

MOE (Molecular Operating Environment; CCG 社) Protein Search を用いて, CB1 受容体の配列と 164 種の GPCR 配列からシークエンスアラインメントをおこない, 20%以上の相同性を持つ GPCR を抽出した. その中で, 最も相同性の高い S1P 受容体(PDB:3V2Y)²⁾, およびアドレナリン β 2 受容体(PDB:4QKX)³⁾をテンプレートとして用いた. 次いで, それぞれのアラインメントをおこなった配列を用いて CB1 受容体のホモロジーモデリング(力場; AMBER12:EHT)をおこなった.

2. CB1 受容体とリガンドとの結合様式解析

Site Finder を用いてモデル構築した 2 種類の CB1 受容体 (CB1_3V2Y, CB1_4QKX) のリガンド結合領域を検出し, 69 種類の CB1 リガンドとのドッキングシミュレーション (力場; MMFF94X) を行うことで, CB1 受容体に対するリガンドの結合様式の解析を行った.

C. 研究結果

1. GPCR テンプレートの探索および CB1 受容体のホモロジーモデリング

はじめに, CB1 受容体のアミノ酸配列 (NCBI reference sequence: NP_001153731.1, 237681175.fst) と 164 種の GPCR のアミノ酸配列からシーケンズアラインメントをおこない, 20% 以上の相同性を持つ 83 種類の GPCR を抽出した. その中で, 最も相同性の高い S1P 受容体 (PDB:3V2Y, 相同性 27.5%), および, GPCR 中にリガンドを含む Human Species のアドレナリン β 2 受容体 (PDB:4QKX, 相同性 23.7%) をテンプレートとして用いることとした (Fig. 1). 次いで, それぞれのアラインメントを行った配列を用いて CB1 受容体のホモロジーモデリング (力場; AMBER12:EHT) をおこなった (Fig. 2). モデル構築した 2 種類の CB1 受容体 (CB1_3V2Y および CB1_4QKX) は, それぞれのテンプレート構造と良い一致を示した (Fig. 3, Fig. 4).

2. CB1 受容体とリガンドとの結合様式解析

CB1_3V2Y および CB1_4QKX に対して, Site Finder を用いたリガンド結合領域の検出を行った. その結果, CB1_3V2Y のリガンド結合領域はアミノ酸 (PHE177 VAL196 THR197 PHE200 ILE267 LEU287 LEU288 PHE289 TYR296 TRP299 LEU359 MET363 PHE379 SER383 CYS386 LEU387) から構成されるポケットを, CB1_4QKX のリガンド結合領域はアミノ酸 (VAL179 ARG182 ASP184 TYR275 LEU276 MET277 PHE278

GLY281 VAL282 TYR283 LYS376) から構成されるポケットを持っていることが明らかとなった. また, CB1_3V2Y と CB1_4QKX のリガンド結合領域を比較すると, ポケットサイズはほぼ同じであるがリガンドが結合する位置に若干の違いが認められた (Fig. 5, Fig. 6). 続いて, CB1 受容体 (CB1_3V2Y, CB1_4QKX) リガンド結合領域と 69 種類の CB1 リガンド (Fig. 7) とのドッキングシミュレーション (リガンドと Alpha 球との一致や, タンパク質との衝突をガウス型の確率密度分布の重なりから評価) によりスコアリングし, 各リガンドの安定結合エネルギー (E_{refine}) 上位 30 個の構造を抽出した. 下記 2 式のスコアリング関数によりドッキングの ΔG を推算した.

スコアリング関数 1 (GBVI/WSA)

$$\Delta G \approx c + \alpha[2/3(\Delta E_{\text{coul}} + \Delta E_{\text{sol}}) + \Delta E_{\text{vdw}} + \beta \Delta SA_{\text{weighted}}]$$

c : エントロピーの増減

α, β : 力場 MMFF94X の定数

E_{coul} : クーロン静電項. 誘電率は 1 で計算

E_{sol} : 溶媒和エネルギー

E_{vdw} : van der Waals 項

SA_{weighted} : 溶媒露出度で重みづけした接触表面積

スコアリング関数 2 (London dG)

$$\Delta G \approx c + E_{\text{flex}} + \Sigma_{\text{CHBfHB}}(H\text{-bonds}) + \Sigma_{\text{CmfM}}(m\text{-lig}) + \Sigma \Delta D_i(\text{atoms } i)$$

E_{flex} : リガンドの自由度エネルギー

$\Sigma_{\text{CHBfHB}}(H\text{-bonds})$: 水素結合エネルギー

$\Sigma_{\text{CmfM}}(m\text{-lig})$: 配位結合エネルギー

$\Sigma \Delta D_i(\text{atoms } i)$: 脱溶媒和エネルギー

D. 考察

CB1_3V2Y あるいは CB1_4QKX と各リガンドの結合エネルギー (E_{refine}) を比較した結果, ほとんどが -46~-36 間 (CB1_3V2Y), -43~-30 間

(CB1_4QKX)に収まっていた(Fig. 8). Fig. 9に示すように、リガンドの多くは CB1 受容体のリガンド結合領域中で疎水性相互作用によって安定なコンフォメーションを形成していた. CB1_3V2Y に関しては、活性の高いリガンドが比較的安定な結合エネルギー[例えば、リガンド 34 (0.2 nM: -46.2), 60 (0.01 nM: -45.8)]を示すことが明らかとなった. CB1_4QKX に関しては、CB1_3V2Y と類似の傾向を示したが、最も活性の高いリガンド 60 における結合エネルギーが低く見積もられていることから(Fig. 8), CB1 リガンドとのドッキングシミュレーションにおいては CB1_3V2Y が適したテンプレートとなり得ることが示唆された.

E. 結論

違法薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的とし、本年度は、CB1 受容体のホモロジーモデリングに用いる GPCR テンプレートの検討、相同性の高い S1P 受容体(PDB:3V2Y)およびアドレナリン β 2 受容体(PDB:4QKX)をそれぞれテンプレートとした CB1 受容体の立体構造を構築、および様々な CB1 リガンド(69 種類)のドッキングシミュレーション、をおこなった. その結果、S1P 受容体をテンプレートとしてモデル構築した CB1_3V2Y を用いることで、リガンドの結合エネルギーと活性との間で良い相関見出せることが明らかとなった. 今後は、Induced-Fit(タンパク質のリガンド結合部位の構造を変化させる)を考慮した Glide(高速・高精度ドッキングプログラム)/Prime(タンパク質立体構造予測プログラム)によるタンパク質-リガンド相互作用解析をおこなうことで、より詳細なドッキングシミュレーションをおこない、コンピュータシミュレーションの妥当性について検証する.

F. 参考文献

1) Montero, C., Campillo, N. E., Goya, P., Paez, J. A. *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 75-83 (2005).

2) Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P., Rosen, H., Stevens, R. C. *Science*, **335**, 851-855 (2012).

3) Weichert, D., Kruse, A. C., Manglik, A., Hiller, C., Zhang, C., Hübner, H., Kobilka, B. K., Gmeiner, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 10744-10748 (2014).

G. 研究発表

1. 論文発表

(MOE を使ったタンパク質モデリング, ドッキングシミュレーションに関する論文)

1) Misawa, T., Yorioka, M., Demizu, Y., Noguchi-Yachide, T., Ohoka, N., Kurashima-Kinoshita, M., Motoyoshi, H., Nojiri, H., Kittaka, A., Makishima, M., Naito, M., Kurihara, M.* Effects of alkyl side chains and terminal hydrophilicity on vitamin D receptor (VDR) agonistic activity based on the diphenylpentane skeleton, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 5362-5366 (2015).

2) Sakakibara, N.* Balboni, G., Congiu, C., Onnis, V., Demizu, Y., Misawa, T., Kurihara, M., Kato, Y., Maruyama, Y., Toyama, M., Okamoto, M., Baba, M. Design, synthesis, and anti-HIV-1 activity of 1-substituted 3-(3,5-dimethylbenzyl)triazine derivatives, *Antiviral Chem. Chemother.*, **24**, 62-71 (2015).

3) Usui, K.* Yamamoto, K., Shimizu, T., Biao, M., Okazumi, M., Demizu, Y., Kurihara, M., Suemune, H.* Synthesis and resolution of substituted [5]carbohelicenes, *J. Org. Chem.*, **80**, 6502-6508 (2015).

4) Shoda, T.* Kato, M., Fujisato, T., Okuhira, K., Demizu, Y., Inoue, H., Naito, M., Kurihara,

- M.* Synthesis and evaluation of tamoxifen derivatives with a long alkyl side chain as selective estrogen receptor down-regulators, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 3091-3096 (2015).
- 5) Yamashita, H., Demizu, Y.,* Misawa, T., Shoda, T., Kurihara, M.* Synthesis of a bis-cationic α,α -disubstituted amino acid (9-amino-bispidine-9-carboxylic acid) and its effects on the conformational properties of peptides, *Tetrahedron*, **71**, 2241-2245 (2015).
- 6) Misawa, T., Demizu, Y.,* Kawamura, M., Yamagata, N., Kurihara, M.* Structural development of stapled short helical peptides as vitamin D receptor (VDR)-coactivator interaction inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 1055-1061 (2015).
- 7) Sakakibara, N.,* Baba, M., Okamoto, M., Toyama, M., Demizu, Y., Misawa, T., Kurihara, M., Irie, K., Kato, Y., Maruyama, T. Design, synthesis and anti-HIV-1 activity of 1-aromatic methyl-substituted 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil and *N*-3,5-dimethylbenzyl-substituted urea derivatives, *Antiviral Chem. Chemother.*, **24**, 3-18 (2015).
2. 学会発表
1. 出水庸介, 三澤隆史, 内山奈穂子, 花尻瑠理, 袴塚高志, 栗原正明: コンピュータシミュレーションによる合成カンナビノイドの CB1 受容体への結合様式解析, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 千葉(2015. 9).
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

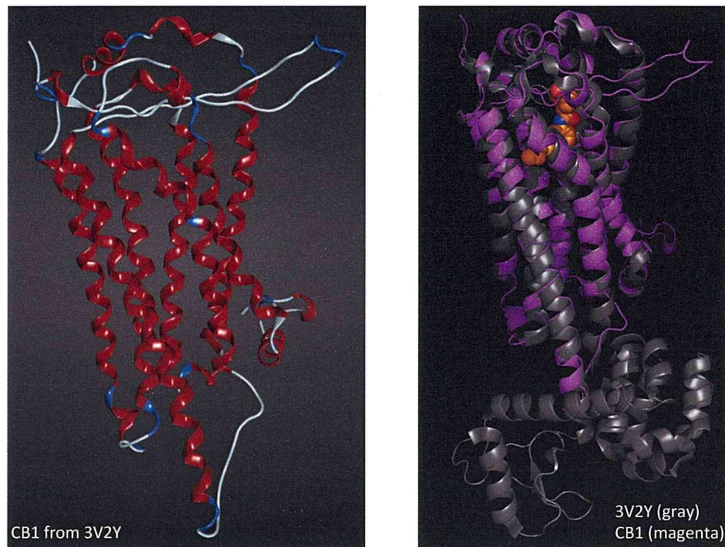


Fig. 3 S1P 受容体からモデル構築した CB1 受容体(CB1_3V2Y)の立体構造(左), および S1P 受容体 (gray)と CB1_3V2Y(magenta)の重ね合わせ図.

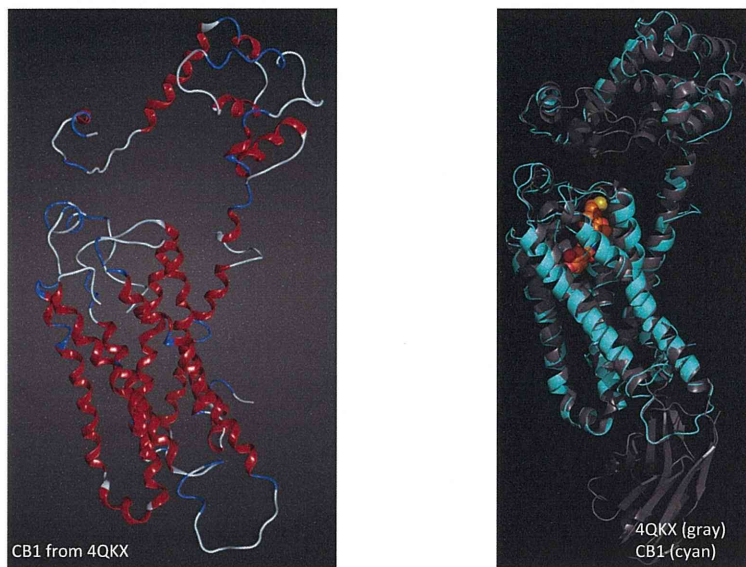


Fig. 4 アドレナリン β 2 受容体からモデル構築した CB1 受容体(CB1_4QKX)の立体構造(左), およびアドレナリン β 2 受容体(gray)と CB1_3V2Y(cyan)の重ね合わせ図.

Site finder of CB1 (3V2Y)

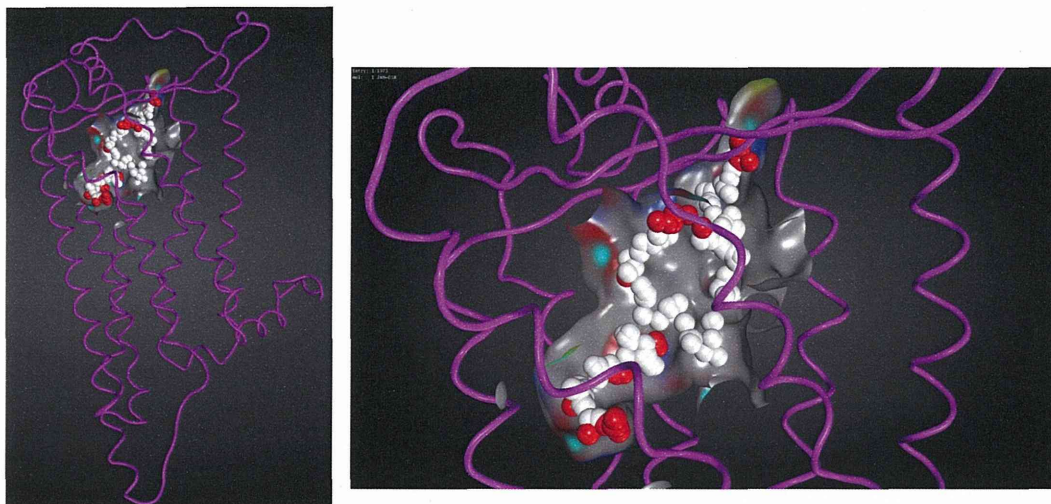


Fig. 5 CB1_3V2Y とリガンド結合領域(白球:疎水性空間, 赤球:親水性空間).

Site finder of CB1 (4QKX)

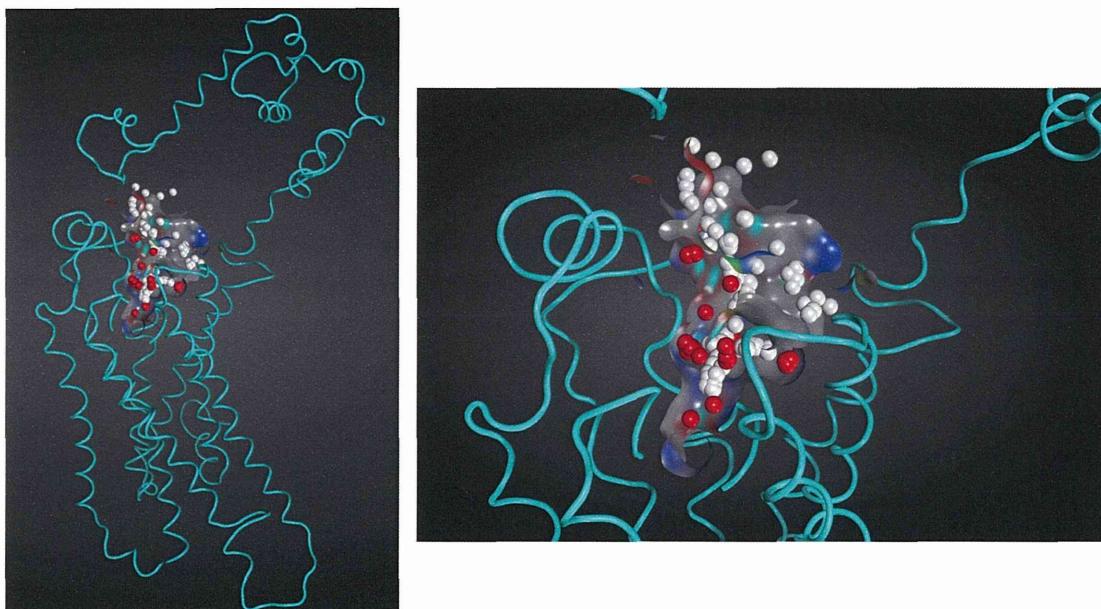


Fig. 6 CB1_4QKX とリガンド結合領域(白球:疎水性空間, 赤球:親水性空間).