

201523006A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス

政策研究事業

危険ドラッグ等の乱用薬物に関する分析情報の収集
及び危害影響予測に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書

(H27-医薬 A-一般-003)

研究代表者 花尻(木倉) 瑠理

平成28年3月

平成27年度 総括・分担研究報告書

危険ドラッグ等の乱用薬物に関する分析情報の収集
及び危害影響予測に関する研究

目次

I. 総括研究報告

危険ドラッグ等に関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究

花尻(木倉)瑠理 1

II. 分担研究報告

1. 危険ドラッグ等に関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究

花尻(木倉)瑠理

危険ドラッグ製品の DART-Orbitrap MS を用いた迅速スクリーニング法の検討

田中 理恵 17

イオンモビリティ質量分析による生体試料中の危険ドラッグ成分スクリーニング分析法の検討

花尻(木倉)瑠理 35

新規流通合成カンナビノイドの *in vitro* 活性評価(受容体結合親和性)について

花尻(木倉)瑠理 47

新規流通危険ドラッグの *in vitro* 活性評価(モノアミン再取り込み阻害活性)について

花尻(木倉)瑠理 53

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

曾我 慶介, 蜂須賀 暁子, 最上 知子 61

新規流通危険ドラッグ 4-AcO-DET の代謝に関する研究

簾内 桃子, 花尻(木倉)瑠理 71

2. 違法ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定

内山 奈穂子

平成 27 年度入手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(1)

内山 奈穂子 79

平成 27 年度入手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(2)

内山 奈穂子 91

Δ^9 -THC と合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与が誘発するマウスの脳活動の解明

小早川 令子 121

3. 合成カンナビノイドの中枢メタボロームへの影響に関する研究

山田 英之

合成カンナビノイドの生体影響と既存乱用薬物との相違:メタボロミクスによる解析

山田 英之 129

4. 危険ドラッグの合成と危害影響予測手法に関する研究

栗原 正明

危険ドラッグ成分の活性評価法の開発

栗原 正明 141

| | |
|---|-----------|
| 5. 危険ドラッグの簡易活性評価手法の検討 | |
| 熊谷 英敏 | |
| 危険ドラッグ成分のセロトニン受容体下流の各種シグナル伝達経路の活性評価法の検討 | |
| 熊谷 英敏 | 147 |
| 6. 危険ドラッグのヒト中枢神経系作用を予測する培養神経細胞による評価系の開発 | |
| 関野 祐子 | |
| 危険ドラッグに含まれる中枢作用性化合物の薬理評価系開発 | |
| 最上 由香里, 佐藤 薫 | 155 |
| 7. 危険ドラッグの脳波による作用評価に関する研究 | |
| 裏出 良博 | |
| 新規流通合成カンナビノイドの自発運動量に及ぼす作用に関する研究 | |
| 内山 奈穂子 | 163 |
| 新規麻薬 25I-NBOMe のマウス脳波に及ぼす作用 | |
| 内山 奈穂子 | 173 |
| 8. 植物系危険ドラッグの基原種の特等に関する研究 | |
| 緒方 潤 | |
| 危険ドラッグ製品に含まれる植物片の基原植物種の同定 (1) | |
| 緒方 潤 | 181 |
| 危険ドラッグ製品に含まれる植物片の基原植物種の同定 (2) | |
| 緒方 潤 | 185 |
| 危険ドラッグ製品に含まれる植物片の基原植物種の同定 (3) | |
| 緒方 潤 | 189 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 195 |

危険ドラッグ等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

研究代表者:花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究要旨:本研究は、指定薬物制度に対応し、具体的な化合物や植物を指定薬物として指定する際に考えられる問題点を科学的に解決し、規制化に必要な評価手法及び科学的データを監視指導・麻薬行政に提供することを目的とする。今年度は、危険ドラッグの継続的な監視体制に対応すべく、より迅速にかつ的確に危害影響を予測しうる迅速分析法及び活性評価手法の検討に重点をおいた。

合成系危険ドラッグについては、インターネットにおける国際的な危険ドラッグ製品流通情報収集や、国連(UNODC)・EU(EMCDDA)・米国(DEA)等の薬物統轄機関と情報交換を密に行うとともに、新規流通化合物の構造決定、迅速分析法の開発及び分析用標品の製造等を行った。平成 27 年度は、新規合成カンナビノイド AB-CHFUPYCA を含む、新規流通危険ドラッグ 41 化合物を同定し、危険ドラッグ合成時の副生成物と考えられる複数の化合物も同定した。これら危険ドラッグ製品及び化合物データについては、国立衛研が構築した「違法ドラッグデータ閲覧システム」に掲載し、Web 上で公的分析機関に対し情報公開を行った。危険ドラッグ製品においては、様々な物性を有する化合物を同時に含有することが多く、分析を行う際に前処理法が問題となる。そこで、前処理やカラムによる分離なしで迅速分析が可能な、リアルタイム直接分析 DART(Direct Analysis in Real Time)イオン源に Orbitrap MS をつなげた DART-Orbitrap MS を用いて、危険ドラッグ成分 402 化合物について MS/MS スペクトルのライブラリを構築し、危険ドラッグ製品中化合物の迅速スクリーニング法を構築した。DART 連続分析用モジュールを用いて実際の危険ドラッグ製品を測定した結果、スクリーニング対象化合物の精密質量、同位体パターン、MS/MS スペクトルのフラグメントイオン、作成したライブラリの MS/MS スペクトルとのマッチングをもとに、製品中化合物の迅速な検出が可能であった。

一方、近年、危険ドラッグが関与した救急搬送事例が問題となっているが、様々な構造や物性を有する新規流通化合物が次々と出現するため、血液や尿試料から原因となる危険ドラッグ成分を特定することが困難となっている。また、平成 26 年度以降、指定薬物の所持・使用に対し罰則が科せられ、生体試料中化合物分析が必須となっている。イオンモビリティ分離法(Ion Mobility Separation:IMS)はイオンが通過するセル内にガスを通気し、連続パルス電圧を印加することで、各化合物イオンの大きさや形状に基づく移動時間を測定し、衝突断面積(Collision cross section:CCS)を得る分析法である。危険ドラッグ及びその代謝物 446 化合物について LC-Q-TOF-MS 分析と同時に IMS 分析を行い、得られた各化合物の保持時間、プレカーサーイオンおよびプロダクトイオン精密質量情報に CCS 値を加えて化合物ライブラリを構築した。これを用いて生体試料中化合物の分析を行ったところ、IMS を併用することにより生体試料由来の夾雑物による影響の軽減が可能で、より精度の高いスクリーニングが可能であった。平成 26 年度から 27 年度にかけて、インドール骨格の 4 位に水酸基もしくはアセトキシ基を有するトリプタミン系化合物が危険ドラッグ市場に出現した。その中から、4-AcO-DET に着目して、ヒト肝マイクロソームを用いて代謝パターンを検討した結果、4-AcO-DET はエステラーゼを介して極めて速やかに、5HT_{2A} 受容体アゴニス

ト活性が 4-AcO-DET の 10 倍以上高い 4-OH-DET に代謝されることが明らかとなった。

指定薬物指定には中枢作用を有する蓋然性が高いことが必要とされているが、そのための的確なスクリーニング法は少なく、規制化の隘路になっている。活性未知の危険ドラッグ成分について、中枢作用を有する蓋然性を科学的に評価することを目的として、まず、コンピューターを用いた化学計算による化合物の *in silico* 評価を検討した。長鎖アルキルを有するカチノン系化合物について、運動活性より QSAR 式を構築して検討した結果、アルキル鎖の長さで運動活性は良い相関を与えることを明らかにした。

In vitro 評価法として、まず、3 種類の活性未知新規流通合成カンナビノイドについて、カンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体に対する結合親和性を測定した結果、2 化合物において大麻活性成分 Δ⁹-THC や麻薬 JWH-018 よりも強い結合性を有することが明らかとなった。新規流通危険ドラッグ 14 化合物を含む計 26 化合物の、モノアミントランスポーターにおけるモノアミン(ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン)再取り込み阻害作用を明らかにするために、ラット脳より調製したシナプトソーム画分を用いて、各 IC₅₀ 値を測定した。その結果、3 化合物以外は、いずれのモノアミンに対しても作用を示すか、ドパミン・ノルアドレナリンもしくはセロトニン、いずれかのモノアミンに選択的に作用を示した。また、これらの作用の違いは、構造と密接に関係していた。ヒトセロトニン受容体 5HT_{2A} と発光タンパク質エクオリンを安定に共発現する組換え細胞系を用い、新規流通危険ドラッグ及び既規制化合物計 24 化合物について、5HT_{2A} を介したアゴニスト活性を評価した。その結果、24 化合物いずれも、5HT_{2A} 受容体に対するアゴニスト活性が認められた。トリプタミン系化合物では、4-AcO 体より 4-OH 体のほうが、アゴニスト活性が強い傾向が認められた。また、トリプタミン骨格の末端アミンや 5 位の付加基が長く嵩高い化合物では、5HT_{2A} 受容体との結合活性が低下することが示唆された。危険ドラッグの主な生体内ターゲットには G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が多いが、GPCR はリガンド結合後に G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達経路を活性化させるだけでなく、β-アレスチンを介した G タンパク質とは独立したシグナル伝達経路も活性化する。そこで、セロトニン受容体 5HT_{2A} に着目し、5HT_{2A} の β-アレスチンシグナル伝達経路を評価するアッセイ系を構築し、6 種類の化合物について評価を行った。その結果、bk-2C-B 以外の 5 種類の被検化合物は、セロトニンと同様に G タンパク質シグナル伝達経路に偏向的なリガンドであったが、bk-2C-B は、両シグナル伝達経路を同等の強さで活性化するユニークな性状を有することが明らかとなった。合成カンナビノイドのカンナビノイド CB₂ 受容体を介した中枢神経系への影響を評価するために、スループットの高い ELISA 法を用い、ラット初代培養ミクログリアの CB₂ 受容体を介した細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase; ERK) 1, 2 のリン酸化応答の定量的解析を可能にした。マウスの全脳を用いて、複数の死亡事件を引き起こした合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB および JWH-018(麻薬)の *c-fos* 発現への影響を検討し、薬物投与により活性化される脳の部位の違い、強度の違い等を検討した。また同時に、大麻の主活性カンナビノイド Δ⁹-THC(麻薬)の結果と比較し、合成カンナビノイドは Δ⁹-THC とは異なり、自律神経応答や情動行動、記憶を制御する脳領域に異常な脳活動を誘発していることを示した。

In vivo 評価系としては、平成 27 年度に製品から検出された危険ドラッグ及び構造類似指定薬物 11 化合物についてマウスの自発運動量に及ぼす作用(抑制及び興奮)を検討した。また、平成 25~27 年度に検討した計 57 化合物について各作用を比較した。その結果、57 化合物中 36 化合物はいずれもマウスの自発運動量を有意に減少させ、特に、アミドエステル類は、陽性対照である JWH-018 と同程度またはそれ以上に強力な行動量抑制作用を示した。また、アミドエステル類やエステル類の一部の合成カンナビノイドにおいては、投与後に痙攣、歩行失調、挙尾反応、四肢の硬直及び無動状態などが観察された。危険ドラッグの中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚等の作用を検出する方法として、動物実験

A. 目的

危険ドラッグの流通と規制の「いたちごっこ」的状況を打破すべく、厚生労働省は、合成カンナビノイド(平成24年度)及びカチノン系化合物(平成25年度及び27年度)を対象として、薬事法(現在の医薬品医療機器等法)下で初めて包括指定を導入した。また、麻薬取締官及び麻薬取締員に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改正法を平成25年10月1日より施行し、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改正法を平成26年4月1日に施行した。さらに、平成26年6月末に起きた池袋の自動車暴走事件後には、危険ドラッグに対し、さらなる規制及び取締り強化が実施された。本自動車暴走事件に関与したとみられる2物質について、7月には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が行われた。その後も次々とスピード規制が行われ、緊急指定後から平成28年2月末までに960(包括指定を含む)が新たに指定薬物として追加され、指定薬物総数は2335(包括指定を含む)となった。また、旧薬事法に基づき、平成26年8月末より断続的に、指定薬物の販売の可能性がある店舗に対し検査命令が実施された。さらに、危険ドラッグに係わる医薬品医療機器等法(旧薬事法)が改正され(平成26年12月施行)、「指定薬物、指定薬物である疑いがある物品」だけではなく、「指定薬物と同等以上に精神毒性を有する蓋然性が高い物である疑いがある物品」についても検査命令及び販売等停止命令を行うことが可能となった。平成27年4月には関税法も改正され、指定薬物(医療等の用途に供するために輸入されるものを除く)が「輸入してはならない貨物」となり、その輸入が罰則の対象となった。これらの規制・取締り強化の結果、平成26年度後半より危険ドラッグ製品の流通は激減し、平成26年3月時点で全国に215店舗存在した危険ドラッグ販売店は、平成27年7月についてゼロとなった。しかし、危険ドラッグ製品のインター

ネット販売やデリバリー販売が完全に消滅したわけではない。また、国外においては、いまだ危険ドラッグの流通が終息する気配はなく、国内においても、形を変えて再び流行する可能性もある。

本研究は、指定薬物制度に対応し、具体的な化合物や植物を指定薬物として指定する際に考えられる問題点を科学的に解決し、規制化に必要な評価手法及び科学的データを監視指導・麻薬行政に提供することを目的に行うものである。平成27年度は、新規流通危険ドラッグ成分について、インターネットにおける国際的な危険ドラッグ製品流通情報や、EU・米国等の薬物統轄機関が発信する海外薬物情報を広く収集するとともに、問題となりうる製品を入手、新規流通化合物の構造決定及び分析用標品の準備・各種分析データの整備、前処理不要な製品の迅速スクリーニング法の開発を行った。また、問題となる危険ドラッグ成分について生体試料中薬物の迅速スクリーニング法を検討した。これら研究成果を、研究代表者らが構築した、危険ドラッグの分析データ等に関するデータベースに収載し、公的分析機関への公開を行った。一方、これら化合物について、中枢神経系へ影響を及ぼす蓋然性を検討するために、まず、QSAR等によるコンピューター活性予測手法を検討した。また、標的となりうる中枢受容体に対する作用評価を行うとともに、危険ドラッグの主な標的分子であるGタンパク質共役型受容体(GPCRs)について、下流の二つの細胞内シグナル伝達経路(Gタンパク質シグナル及び β -アレスチンシグナル)の活性化をそれぞれ指標としたアッセイ系の構築を検討した。さらに、ミクログリアを用いて合成カンナビノイドのCB₂受容体を介した中枢神経系への作用を評価する試験系の構築を試みた。ヘロイン、大麻由来成分の Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(Δ^9 -THC)、および合成カンナビノイドJWH-018により引き起こされる生体応答のメカニズム理解のために、マウス脳のメタボロームに及ぼす影響を解析した。動物実験用脳波解析システムを使用し、新規流通危険ドラッグのマウス脳波

に及ぼす影響を検討して特徴的な脳波の分類を試みるとともに、これら薬物がマウスの自発運動に及ぼす影響を評価した。植物系危険ドラッグについては、市場に流通する植物製品の遺伝子解析による基原種の特定及び成分分析を行った。

B. 研究方法

1. 危険ドラッグ等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

1) 危険ドラッグ製品の DART-Orbitrap MS を用いた迅速スクリーニング法の検討

危険ドラッグ製品の迅速スクリーニング法の構築を目的として、DART イオン源に Orbitrap MS をつなげた DART-Orbitrap MS による危険ドラッグ製品の分析を検討した。スクリーニング分析の対象とした指定薬物とその関連化合物を中心とする標準試薬の MS/MS スペクトルを測定し、ライブラリを構築した。次に GC-MS, LC-MS 分析で危険ドラッグ成分の含有を確認済みの製品について DART-Orbitrap MS で、DART 連続分析用モジュール用いて測定を行なった。スクリーニング対象化合物の精密質量、同位体パターン、MS/MS スペクトルのフラグメントイオン、作成したライブラリの MS/MS スペクトルとのマッチングをもとに危険ドラッグ製品中の成分の検出を行なった。

2) イオンモビリティ質量分析による生体試料中の危険ドラッグ成分スクリーニング分析法の検討

液体クロマトグラフー四重極型/飛行時間型質量分析計 (LC-Q-TOF-MS) に、イオンモビリティ分離法 (Ion Mobility Separation: IMS) を組み込んだ IMS-Q-TOF-MS を用いた生体試料中危険ドラッグの分析法を開発した。まず、危険ドラッグ 446 化合物について LC-Q-TOF-MS 分析と同時に IMS 分析を行い、得られた各化合物の保持時間、プレカーサーイオンおよびプロダクトイオン精密質量情報に CCS 値を加えて化合物ライブラリを構築した。さらに、本スクリーニング法を、実際に危険ドラッグが起因したと考えられる 4 名の死亡事例に

おける血清試料中化合物のスクリーニング分析に適用し、その有用性を評価した。

(倫理面の配慮)

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会の承認を経て、各委員会の定める規定に則り遵守すべき規準に従って実施した。

3) 流通合成カンナビノイドの in vitro 活性(受容体結合親和性)評価について

新規流通合成カンナビノイド 3 化合物 Fu-PX-2, AB-CHFUPYCA, CUMYL-5F-PINACA について、カンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体への結合親和性を測定し、中枢神経系へ影響を及ぼす蓋然性について検討した。それぞれの受容体に対する各化合物の dose-response curve を作成し、トレーサー (CP-55,940 ³H ラベル体) と受容体の結合を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。陽性対照として、(R)-(+)-WIN55212-2 を使用した。

4) 新規流通違法ドラッグの in vitro 活性評価(モノアミン再取り込み阻害活性)について

麻薬 Ethcathinone, 既報で報告した 11 化合物及び平成 25 年度以降に危険ドラッグ市場に出現した 14 化合物の計 26 化合物について、ラット脳シナプトソーム画分における Dopamine, Noradrenaline 及び Serotonin 再取り込み阻害活性 (IC₅₀ 値) を測定した。陽性対照として、それぞれ GBR12909, Desipramine, Imipramine を使用した。

5) 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

ヒト 5HT_{2A} 受容体, G タンパク質 (Gα16), Apoequorin を発現する CHO-K1 細胞を用いて、計 24 種 (フェネチルアミン・カチノン系またはトリプタミン系化合物) について、5HT_{2A} 受容体を介したアゴニスト活性を評価した。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 軸にプロットしてシグモイド曲線を作成し、50% 効果濃度 (EC₅₀) を算出した。陽性対照として、TCB-2 及び活性既知の麻薬 DOI を使用した。

6) 新規流通危険ドラッグ 4-AcO-DET の代謝に関する研究

ヒト肝ミクロソームを用いて、NADPH 存在下で 4-AcO-DET の代謝産物を検討した。また、肝ミクロソーム中 CYP 酵素による代謝反応は NADPH-電子伝達系に依存することから、CYP 酵素以外の関与を検討するために、NADPH の添加効果についても検討した。さらに、カルボキシルエステラーゼの関与を検討するために、特異的阻害剤である bis(4-nitrophenyl) phosphate (BNPP) を用い、4-AcO-DET の脱アセチル化活性に及ぼす阻害効果についても検討した。

(倫理面の配慮)

ヒト肝ミクロソームは、個人情報と確実に連結不可能匿名化されている市販品で、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会において審査「非該当」と判断されたものを使用した。

2. 違法ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定

1) 平成 27 年度入手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

主に平成 27 年度に入手した危険ドラッグ製品について GC-MS, LC-MS 分析を行った。この内、未知の成分が検出された製品から、Recycle HPLC 及び分取 HPLC 等を用いて各化合物を単離し、LC-Q-TOF-MS 及び NMR を用いて同定を行った。また、標準品があるものについては直接比較し、同定した。

2) Δ^9 -THC と合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与が誘発するマウスの脳活動の解明

マウスに Δ^9 -THC, 5F-ADB, JWH-018 の何れかの薬剤を投与した際に誘発される脳活動を神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の発現を指標に解析した。C57/BL6 マウスに、 Δ^9 -THC (10 mg/kg), 5-fluoro-ADB (5 mg/kg), JWH-018 (5 mg/kg) をそれぞれ腹腔内に注射した。注射後 60 分後にマウスをイソフルラン麻酔し、4% パラホル

ムアルデヒドで還流固定後、脳を摘出した。摘出した脳は 4% パラホルムアルデヒドで一晩後固定したのちに、パラフィンブロックを作成し、自動パラフィン切片作製装置を用いて 5 μ m の切片を作成した。得られた切片は自動 *in situ* Hybridization 装置を用いて *c-fos* mRNA の発現を検出した。*c-fos* mRNA 発現量の定量は、バーチャルスライドスキャナーで得られた染色像について画像解析ソフトを用いて白黒画像に変換後、扁桃体中心核 (CeA), 室傍核 (PVN), 視索上核 (SO) のそれぞれの領域に存在するシグナルの平均値を計測して行った。

(倫理面の配慮)

動物実験は、関西医科大学の「動物実験に関する指針」を厳守し、動物福祉の観点に基づいて、適切な実験計画、実験手技のもとで実施した。

3. 合成カンナビノイドの中枢メタボロームへの影響に関する研究

合成カンナビノイド JWH-018, 既存の乱用薬物ヘロインおよび Δ^9 -THC がメタボロームに及ぼす影響を検討した。C57BL/6J 雄性マウスに、ヘロイン 15 μ mol/kg/10 mL (i.p.) を一日 2 回, 12 日間投与し、最終投与 16 時間後、麻酔し、脳を摘出した。 Δ^9 -THC はエタノールに溶解後、生理食塩液でエタノールの終濃度 2% となるように希釈し、5.6 mg/kg/10 mL (i.p.) を一日 1 回, 12 日間投与し、最終投与 24 時間後に、麻酔、採血し、脳を摘出した。また、JWH-018 は、エタノールと Tween 80 の 1:1 混合液に溶解し、生理食塩液でそれぞれの終濃度が 2% となるように希釈し投与液とした。これを低用量群 (1 mg/kg/10 mL, i.p.) と高用量群 (6 mg/kg/10 mL, i.p.) として投与し、投与 2 時間後に、麻酔、採血し、脳を摘出した。採取した組織を MeOH:CH₃CN:H₂O (2:2:1, v/v) で抽出して、UPLC-TOF/MS を用いてメタボローム解析を行った。統計解析には One-way ANOVA と post hoc Tukey test を用いた。バイオマーカー候補物質の同定には、HMDB データベース、PubChem 化合

物データベースおよび KEGG を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号:A26-250-2。

4. 危険ドラッグの合成と危害影響予測手法に関する研究

危険ドラッグとして流通しているカチノン系化合物について運動活性を用いて QSAR (定量的構造活性相関) 法を適用し、長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物の活性予測を検討した。QSAR 式の構築には、別途、自発運動量測定を実施した 12 化合物の実測値を用い、化学計算パッケージ MOE を使用した。QSAR 法は AutoQuaSAR 法を使って妥当な QSAR モデル式を構築した。QSAR モデル式で用いた記述子は、MOE 上で動作する AutoQuaSAR プログラムによって、MOE に搭載されている 184 のすべての 2D 記述子から選択されたものである。QSAR 式は交差検定の R^2 (相関係数の 2 乗) が最も良いものを用いた。

5. 危険ドラッグの簡易活性評価手法の検討

5-HT_{2A} 受容体下流の二つのシグナル伝達経路のそれぞれに対するフェネチルアミン系化合物の活性を評価するために、G タンパク質を介するシグナル伝達経路の活性化をモニターするアッセイ系に加えて、今年度は、新たに β -アレスチン経路の活性化をモニターできるアッセイ系の構築を検討した。 β -アレスチン経路の評価は、アゴニスト刺激依存的に惹起される 5-HT_{2A} 受容体と β -アレスチンの会合を酵素断片コンプリメンテーション法によって特異的に定量するアッセイ系を用いて行った。本アッセイ系により、6 種類の化合物 (3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 25D-NBOMe, DOI, 4-OH-MET) 及び陽性コントロールとしてセロトニンの EC₅₀ 値を測定した。

6. 危険ドラッグに含まれる中枢作用性化合物の薬理評価系開発

ミクログリアを用いて合成カンナビノイドのカンナビノイド CB₂ 受容体を介した中枢神経系への作用を評価する試験系の構築を試みた。CB₂ 受容体を介した ERK1, 2 のリン酸化を Western Blotting 法で定量し、さらに ELISA 法を用いた評価系の構築を検討した。

7. 危険ドラッグのヒト中枢神経系作用を予測する培養神経細胞による評価系の開発

1) 新規流通合成カンナビノイドの自発運動量に及ぼす作用に関する研究

主に平成 27 年度に国内(外)で流通した危険ドラッグ製品から新たに検出された合成カンナビノイド及びその類似化合物 (指定薬物 5 化合物, 未規制 6 化合物: 計 11 化合物) についてマウスの自発運動量に及ぼす作用を検討した。陽性対照として JWH-018 (麻薬) を用いた。さらに、これら化合物を含め、平成 25~27 年度に検討した計 57 化合物 (指定薬物 48 化合物, 未規制 9 化合物) について各作用を比較した。C57BL/6 系雄性マウスに、各薬物 5 mg/kg を腹腔内投与した。投与は暗期開始時刻 (19:00) 直前に行い、1 日目は溶媒単独のコントロールとして、vehicle (溶媒) のみを投与し、2 日目に薬物を投与した (n = 3~4)。薬物投与マウスを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。(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。

2) 新規麻薬 25I-NBOMe のマウス脳波に及ぼす作用

平成 27 年 11 月に指定薬物から新たに麻薬となった 25I-NBOMe 及び陽性対照 2CI (麻薬) を、マ

ウスの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。C57BL/6 系雄性マウスに脳波・筋電位測定用の電極の留置手術を実施し、回復用チャンバーに 10 日間おいて回復させた。その後、記録用チャンバーに移して電極に測定用ケーブルを接続し、4 日間順応させた。25I-NBOMe 及び 2CI を 2.5 mg/kg ずつマウスに腹腔内投与した。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)。脳波および筋電位は増幅(脳波:0.5-35 Hz, 筋電位:16-128 Hz)後、サンプリング速度:128 Hz でデジタル化して記録した。また、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。

(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。

8. 植物系危険ドラッグの基原種の特定等に関する研究

危険ドラッグ製品に使用されている植物種を明らかにするために、DNA 塩基配列を指標とした植物基原種の同定を行った。葉緑体および核ゲノム DNA 上の 5 領域 (*matK*, *rbcL*, *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, ITS) を分析対象塩基配列として、各製品から得られた DNA より各植物特異的プライマーを用い PCR 法によって各領域の DNA 増幅を行った。得られた PCR 増幅 DNA 断片はサンガーシーケンス法により塩基配列を決定した。決定された塩基配列は国際塩基配列データベースと照合し、種(属)を決定した。

C. 結果及び考察

1. 危険ドラッグ等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

1) 危険ドラッグ製品の DART-Orbitrap MS を用いた迅速スクリーニング法の検討

麻薬・指定薬物とその関連化合物を中心とする化合物の標準試薬について DART-Orbitrap MS で MS および MS/MS スペクトルデータを取得し、ライブラリの作成を行なった。これをもとにスクリーニングメソッドを構築し、危険ドラッグ製品のハイスループット分析を検討した。その結果、乾燥植物細片、液体製品及び粉末製品とも含有される化合物の検出が可能であり、また試料調製―測定―解析まで 30 分ほどで行うことが可能であった。さらに、測定試料を連続分析用モジュールにセットして DART-Orbitrap MS へ導入して分析する方法では、多くの試料を測定する場合に非常に効率よく行なうことができた。

2) イオンモビリティ質量分析による生体試料中の危険ドラッグ成分スクリーニング分析法の検討

LC-IMS-Q-TOF-MS 分析において、危険ドラッグ等 446 化合物を対象に、保持時間、プレカーサーイオンおよびプロダクトイオン精密質量情報、CCS 値を収載したライブラリを構築した。これを用いて、危険ドラッグが起因したと考えられる 4 名の死亡事例における血清試料中化合物の分析を行ったところ、LC-IMS-Q-TOF-MS を用いたスクリーニング分析では、LC-Q-TOF-MS 分析時と比較して、化合物の CCS 値を解析に用いることで、より信頼性や特異性の高いスクリーニング分析が可能であった。

3) 流通合成カンナビノイドの in vitro 活性(受容体結合親和性)評価について

測定した 3 化合物のうち、pyrazole 型の新規合成カンナビノイド AB-CHFUPYCA は、カンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体の両方に対しほとんど親和性を示さなかった。一方、FU-PX-2 及び indazole-3-carboxamide タイプの合成カンナビノイド CUMYL-5F-PINACA は、CB₁ 及び CB₂ 受容体に対し強い結合親和性を示し、特に CUMYL-5F-PINACA は CB₁ 受容体に対して、

陽性対照の(R)-(+)-WIN55212-2 よりも強い親和性を示した。

4) 新規流通違法ドラッグの in vitro 活性評価(モノアミン再取り込み阻害活性)について

4-Methoxy-*N,N*-dimethylcathinone, 3C-E 及び Nitracaine はいずれのモノアミンに対しても再取り込み阻害活性を示さなかった。また, Dopamine, Noradrenaline 及び Serotonin に対して, それぞれ Methylnaphthidate, 3,4-Dimethyl- α -PVP, Methamnetamine が, 測定化合物中最も強い再取り込み阻害活性を示した。カチノン系化合物では, ベンゼン環上のメキシ基及びメチレンジオキシ基, テトラリン構造, ピロリジン構造の導入, またアルキル主鎖の長さにより, 3 種類のモノアミン再取り込み阻害活性パターンが異なることが示唆された。さらに, フェニデート系化合物においては, いずれも強い Dopamine 及び Noradrenaline の再取り込み阻害活性が認められたが, ナフタレン構造を有する化合物は, Serotonin に対しても比較的強い阻害活性を有していた。チオフェン構造を有する Methiopropamine 及び α -PVT, フェネチルアミン構造を有する β -Methylphenethylamine は比較的強い, そして Mephedramine はやや弱い Dopamine 及び Noradrenaline の再取り込み阻害活性を有していたが, いずれも Serotonin 再取り込み阻害活性は認められなかった。フェンメトラジン系化合物は, いずれのモノアミンに対しても比較的強い再取り込み阻害活性を示した。

5) 新規流通危険ドラッグ成分の Aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} functional assay を用いたセロトニン受容体活性評価

本研究で測定した新規流通化合物において, いずれも 5HT_{2A} 受容体に対するアゴニスト活性が認められた。トリプタミン系化合物では, AcO 基誘導体より OH 基誘導体のほうが, アゴニスト活性が強い傾向が認められた。また, トリプタミン骨格の末端アミンへの付加基が長く嵩高い化合物では, 5HT_{2A} 受容体との結合活性が低下することが示唆された。

6) 新規流通危険ドラッグ 4-AcO-DET の代謝に関する研究

ヒト肝マイクロソーム画分を用いて 4-AcO-DET の代謝的検討を行った結果, 1) 4-AcO-DET は, ヒト肝マイクロソーム画分の酵素により 4-OH 体に変換されること, 2) 4-AcO-DET から 4-OH-DET への変換は NADPH に非依存的な反応であること, 3) カルボキシルエステラーゼの特異的阻害剤である BNPP を用いて検討した結果, 4-OH-DET への変換を担う酵素は肝臓の CYP ではなくカルボキシルエステラーゼであること, 4) カルボキシルエステラーゼによる脱アセチル化反応は極めて速いこと, が明らかとなった。別途行った研究では, 4 位にアセトキシ基を有するトリプタミン系化合物よりも, 4 位に水酸基を有する化合物の方が, セロトニン 5-HT_{2A} 受容体に対するアゴニスト活性が強いことが明らかとなっている。従って, 4-AcO-DET を代表とする 4 位にアセトキシ基を有するトリプタミン系化合物は, 生体内でより活性の強い 4-OH 体を速やかに生成する可能性が示唆された。

2. 違法ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定

1) 平成 27 年度入手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

平成 27 年度に入手した危険ドラッグ製品中から, 計 41 種類の新規流通化合物を同定した。内訳として, pyrazole 型の新規合成カンナビノイド AB-CHFUPYCA を含む 6 種の合成カンナビノイド [MDMB-CHMICA (MMB-CHMINACA) 他], 4 種のカチノン系化合物 (*N,N*-dimethylpentylone 他), 6 種のトリプタミン系化合物 (4-AcO-MIPT 他), 25I-NB34MD を含む 3 種のフェネチルアミン系化合物, ピペラジン系化合物 DF-MDBP を同定した。さらに, 新たな危険ドラッグ成分のグループとして向精神薬のアナログである 7 種のベンゾジアゼピン系化合物 (Clonazepam 他) を同定した。また, その他に, methylphenidate (向精神薬) の類似体 3 種 (Isopropylphenidate 他), Phenmetrazine

(向精神薬)の類似体2種 [3-Fluorophenmetrazine (3-FPM)他], Methamnetamine, Mephetetramine (MTTA), PCP (麻薬)の類似体である3-MeO-PCMo, NMDA受容体チャンネルブロッカーであるdiphenidine(指定薬物)の誘導体 Ephenidine, さらに, Nitracaine, NSI-189 や modafinil(向精神薬)の類似体3種 (Modafiendz 他)を検出した.

2) Δ^9 -THC と合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB,

JWH-018 の投与が誘発するマウスの脳活動の解明

Δ^9 -THC, 5F-ADB, JWH-018 はいずれも共通して扁桃体中心核, 分界条床核, 傍小脳脚核の *c-fos* mRNA 発現を誘導したが, 5F-ADB, JWH-018 はこれらに加え, 外側および内側視索前野, 外側中隔核, 視床下部室傍核, 視床室傍核, 視索上核, 青斑核における強力な *c-fos* mRNA の発現も誘導した. これらの結果から, 合成カンナビノイドは Δ^9 -THC とは異なり, 自律神経応答や情動行動, 記憶を制御する脳領域に異常な脳活動を誘発していることが明らかになった.

3. 合成カンナビノイドの中枢メタボロームへの影響に関する研究

本研究により, Δ^9 -THC および JWH-018 により内因性カンナビノイド, ビローダミン(*O*-アラキドノイルエタノールアミン; *O*-AEA)が増加することが明らかとなり, 両化合物に共通したバイオマーカーになる可能性が考えられた. なお, これら化合物により, 内因性カンナビノイドレベルが増加することが初めて示唆された. また, 脳の *N*-アセチルアスパラギン酸はヘロインでは低下したが, Δ^9 -THC と JWH-018 ではいずれも増加したことから, *N*-アセチルアスパラギン酸についても, 両化合物に共通したバイオマーカーになる可能性が示唆された.

4. 危険ドラッグの合成と危害影響予測手法に関する研究

12化合物の運動活性から QSAR 式を構築した. QSAR 式は3つの記述子を使い, その交差検定の値は0.8208であった. また, QSAR 式から予測値を求めたところ, 妥当な値が得られた. 今後, 本研究で構築した QSAR 式を使い他の化合物への適用を検討する必要がある. また, 異なる方法による活性値を統合する方法論の開発も必要である.

5. 危険ドラッグの簡易活性評価手法の検討

本研究において, 酵素断片コンプリメンテーション法を用いて確立した β -アレスチンシグナル伝達経路に対するアッセイ系でのセロトニンの EC_{50} はおおよそ160 nMであり, Gタンパク質シグナル伝達経路に対する EC_{50} (セロトニンに対する EC_{50} , 2.9 nM)の55分の1の感度であった. 6種類の被検化合物は, ヒト5HT_{2A}受容体下流の両シグナル伝達経路を用量依存的に活性化し, Gタンパク質シグナル伝達経路に対する活性の強度は 25D-NBOMe> DOI>> 4-OH MET> 3C-E> Allylescaline>> bk-2C-B であり, β -アレスチンシグナル伝達経路に対する活性の強度は 25D-NBOMe>> DOI>> 4-OH MET> bk-2C-B> 3C-E> Allylescaline であった. 6種類の被検化合物の中では, 3C-E, Allylescaline, DOI, 25D-NBOMe 及び 4-OH MET はセロトニンと類似した Gタンパク質経路偏向性のリガンドであることが示されたが, bk-2C-B はそれらとは異なり, 両シグナル伝達経路に対して活性は弱いものの同程度の活性強度を有する特性が見出された. β -アレスチン経路の下流では MAPキナーゼなどの活性化がおこなわれているので, bk-2C-B により活性化されたセロトニン作動神経は新たな遺伝子発現を介して生理的性状が変化する可能性が示唆された.

6. 危険ドラッグに含まれる中枢作用性化合物の薬理評価系開発

合成カンナビノイドの中枢影響評価系開発とし

て、スループットの高い ELISA 法を用い、ラット初代培養ミクログリアの CB₂ 受容体を介した応答の定量解析を可能にした。無刺激時および LPS 活性化時のミクログリアで CB₂ 受容体を介した ERK1, 2 のリン酸化応答を定量的に評価し、いずれの条件においても評価可能であることを示した。CB₂ 受容体を介した正常時のミクログリアに対する作用を評価するには、無刺激時のミクログリアを用いた実験が望ましいと考えられた。感度や安定性を改善すれば、危険ドラッグに含まれる合成カンナビノイドの中枢機能変調を同定する評価系として有用である。

7. 危険ドラッグのヒト中枢神経系作用を予測する培養神経細胞による評価系の開発

1) 新規流通合成カンナビノイドの自発運動量に及ぼす作用に関する研究

57化合物中36化合物はいずれもマウスの自発運動量を有意に減少させ、特に、アミドエステル類(5Fluoro-ADB 等)は、陽性対照である JWH-018 と同程度またはそれ以上に強力な行動量抑制作用を示した。また、今回検討した合成カンナビノイドの行動を観察したところ、アミドエステル類(5Fluoro-ADB 等)やエステル類(NM2201 等)の一部の化合物で投与後に痙攣、歩行失調、挙尾反応、四肢の硬直及び無動状態などが観察された。以上の結果から、これら新規流通合成カンナビノイドの摂取により重篤な健康被害が生じる可能性が危惧された。

2) 新規麻薬 25I-NBOMe のマウス脳波に及ぼす作用

25I-NBOMe は投与 30-50 分後までマウスの自発運動量を有意に減少させ、その抑制作用の持続時間は 2CI と同じであった。さらに、25I-NBOMe 及び 2CI はマウスの脳波パターンに変化を与えたが、両化合物の脳波スペクトルに明らかな共通パターンはみられなかった。また、両化合物ともに、それぞれ自発運動量の抑制作用と

脳波の周波数変化の発現時間に明らかな相関はみられなかった。既報から、ラットの場合、類似構造をもつ薬物群によって、ある程度共通した脳波パターンの変化を起こすと考えられたが、マウスの場合、類似の脳波パターンはみられなかった。従って、今後詳細な解析、検討が必要であると考えられる。

8. 植物系危険ドラッグの基原種の特等に関する研究

危険ドラッグ市場に流通する植物系危険ドラッグ 16 製品について DNA 塩基配列情報を用いた基原植物同定を行った。危険ドラッグ製品取り締まり強化により、違法ドラッグ市場には危険ドラッグ製品以前に流通していたダミアナ、スイレン、ハス、ドリームハーブが危険ドラッグ成分を含まない製品として検出された。また、危険ドラッグ成分を含む製品として、ヘナトウーに利用されるヘンナや、ホップなどが検出された。さらに、ハワイアンベイビーウッドローズの種子および粉砕物(カプセル剤として加工)が検出された。種子の一部は発芽させ現在生育中(生育後、再分析)である。ミトラギニンを検出した製品に関しては、ミトラギニンを含有する植物クラートン(*Mitragyna speciosa*) DNA は検出されず、*Sceletium* (*Mesembryanthemum*) を含むメセン属植物由来 DNA が検出された。これは、ミトラギニン成分のみを他植物に添加したものと考えられた。また、ハルミン・ハルマリンを検出した製品からは DNA が検出されなかった。

D. 結論

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

平成 27 年度においては、危険ドラッグ製品から、新規合成カンナビノイド AB-CHFUPYCA を

含む、新規流通危険ドラッグ 41 化合物を同定すると共に、危険ドラッグ合成時の副生成物と考えられる複数の化合物を同定した。また、前処理やカラムによる分離なしで迅速な分析が可能である DART-Orbitrap MS を用いて、危険ドラッグ製品中 402 化合物の迅速スクリーニング法を開発した。救急搬送時例等への対応及び指定薬物の所持・使用規制化を鑑み、危険ドラッグ 446 化合物を対象に、LC-Q-TOF-MS 分析にイオンモビリティ分離法を組み合わせた、より精度の高い生体試料中危険ドラッグスクリーニング法を開発した。新規流通トリプタミン系化合物 4-AcO-DET について、ヒト肝マイクロゾームを用いて代謝を検討し、エステラーゼを介して、より活性が高い 4-OH 体に速やかに代謝されることを明らかにした。In silico 評価法により、カチノン系化合物のアルキル鎖の長さや運動活性には良い相関関係があることを明らかにした。In vitro 評価法として、合成カンナビノイド 3 化合物について、カンナビノイド CB₁ 及び CB₂ 受容体に対する結合親和性を測定した。また、新規流通危険ドラッグ 14 化合物を含む計 26 化合物について、ラット脳より調製したシナプトソーム画分を用いて、3 種類のモノアミン再取り込み阻害作用を検討した。さらに新規流通危険ドラッグ及び既規制化合物計 24 化合物について、セロトニン受容体 5HT_{2A} と発光タンパク質を安定に共発現する組換え細胞系を用い、5HT_{2A} を介したアゴニスト活性を評価した。セロトニン受容体 5HT_{2A} に着目し、受容体下流の二つの細胞内シグナル伝達経路(G タンパク質シグナル及び β-arrestin シグナル)の活性化を指標としたアッセイ系を検討した。初代培養マイクログリアの CB₂ 受容体を介した ERK リン酸化反応を利用して、CB₂ 受容体と合成カンナビノイドの相互作用の定量評価を可能にした。マウスの全脳を用いて、2 種類の合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB 及び JWH-018 (麻薬) と大麻主活性成分 Δ⁹-THC (麻薬) が神経活動マーカー遺伝子 (c-fos mRNA) の発現に及ぼす作用を比較検討した。

In vivo 評価系としては、新規流通危険ドラッグ 11 化合物についてマウスの自発運動量に及ぼす作用(抑制及び興奮)を検討すると共に、平成 25～27 年度に検討した計 57 化合物について各作用を比較した。また、動物実験用脳波解析システムを用いて、危険ドラッグ(ジフェニジン、エフェニジン、25I-NBOMe)がマウスの脳波パターンに及ぼす変化や、自発運動量と脳波の周波数変化との関連性等について解析した。危険ドラッグ市場に流通する植物系危険ドラッグ 16 製品について、DNA 塩基配列情報を用いた基原植物同定を行った結果、危険ドラッグ製品取り締まり強化により、以前流通していた向精神活性成分を有する植物の流通増加が確認された。

上記の研究結果の一部は、平成 27 年 4 月 24 日(カチノン系化合物包括規制 827 物質)、5 月 21 日(6 物質)、6 月 23 日(3 物質)、7 月 28 日(4 物質)、8 月 18 日(6 物質)、9 月 15 日(4 物質)、10 月 22 日(1 物質)、11 月 24 日(8 物質)、12 月 14 日(3 物質)、平成 28 年 1 月 20 日(3 物質)及び 2 月 9 日(4 物質)に厚生労働省が開催した薬事・食品衛生審議会の指定薬物部会において、問題となる薬物を指定薬物に指定するための判断根拠となる科学的データとして提示された。また、その審議結果をうけ、薬事法第 2 条第 14 項に規定する指定薬物及び同法第 76 条の 4 に規定する医療等の用途を定める省令の一部を改正する省令により新たに指定薬物として合計 869 物質(新規に包括指定された化合物を含む)が新たに指定薬物として追加された。また、上記新規指定薬物について、本研究において検討した分析データを参照して国立衛研が取りまとめ、厚生労働省監視指導・麻薬対策課長通知として、測定データ 12 報を全国に発出した。(平成 27 年 5 月 27 日厚生労働省監視指導・麻薬対策課長通知薬食監麻発 0527 第 4, 5 号, 平成 27 年 5 月 27 日薬食監麻発 0527 第 2, 3 号, 平成 27 年 7 月 3 日薬食監麻発 0703 第 1, 2 号, 平成 27 年 7 月 10 日薬食監麻発 0710 第 16, 17 号, 平成 27

年 8 月 7 日薬食監麻発 0807 第 4, 5 号, 平成 27 年 8 月 27 日薬食監麻発 0827 第 1, 2 号, 平成 27 年 9 月 25 日薬食監麻発 0925 第 7, 8 号, 平成 27 年 12 月 4 日薬食監麻発 1204 第 1, 2 号, 平成 27 年 12 月 25 日薬食監麻発 1225 第 2, 3 号, 平成 28 年 1 月 29 日薬食監麻発 0129 第 12, 13 号, 平成 28 年 2 月 19 日薬食監麻発 0219 第 7, 8 号, 平成 28 年 2 月 26 日薬食監麻発 0226 第 2, 3 号「指定薬物の測定結果等について」).

さらに, 研究成果の一部については, 平成 27 年 11 月 13 日に, 厚生労働省の依頼により国立衛研で開催した「平成 27 年度指定薬物分析研修会議」(全国 46 都道府県の地方衛生研究所から 62 名, 関東信越麻薬取締部から 2 名が参加)において説明を行った. また, 厚生労働省を通じて, 地方衛生研究所, 麻薬取締部及び科学捜査研究所等各検査機関へ分析用標品を交付した. その他, 厚生労働省を通して正式な依頼を受け, 地方衛生研究所等の公的分析機関から送付された違法ドラッグ製品について含有成分分析を実施した. また, 研究代表者らが構築した国立医薬品食品衛生研究所違法ドラッグデータ閲覧システムに, 本研究をもとに測定した GC-MS, LC-PDA-MS の分析データを追加収録し, 公的分析機関に公開した. 平成 28 年 2 月 28 日の時点で, 国立衛研で分析を行った 694 化合物 (PDE5 阻害剤を含む) 及び 2128 製品に関する情報を収録しており, 国内機関 277, 国外機関 24 機関 (部署) が登録している.

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

E. 健康危機情報

特になし.

F. 研究発表

1. 学会・講演発表

- 1) 花尻(木倉)瑠理: 合成カンナビノイドの法規制と流通実態変化, 日本法中毒学会第 34 年会シンポジウム(2015.6, 福岡).
- 2) 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 佐藤太, 袴塚高志: LC-Q-TOF-MS を用いた生体試料中危険ドラッグ成分のスクリーニング法の検討, 日本法中毒学会第 34 年会(2015.6, 福岡).
- 3) 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, 日本法中毒学会第 34 年会(2015.6, 福岡).
- 4) 工藤恵子, 臼元洋介, 花尻(木倉)瑠理, 辻彰子, 池田典昭: 危険ドラッグによる中毒死事例における, 血液および尿中 4-methoxy PV8、PV9、4-methoxy PV9、diphenidine の同時分析, 日本法中毒学会第 34 年会(2015.6, 福岡).
- 5) 花尻(木倉)瑠理: 危険ドラッグの法規制と流通実態の変化, 2015 年第 2 回 TMS 研究会講演会(2015.7, 東京)
- 6) 花尻(木倉)瑠理: 危険ドラッグをいかに分析するか, 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(2015. 8, 長崎).
- 7) Nahoko Uchiyama, Kosuke Aritake, Ruri Kikura-Hanajiri, Takashi Hakamatsuka¹, Yoshihiro Urade: Effects of recently-emerged synthetic cannabinoids on locomotor activity in mice. TIAFT2015 (2015.8, Italy, Florence).
- 8) Kikura-Hanajiri R., Uchiyama N., Hakamatsuka T. Evaluation of the binding affinities of 54 newly-emerged Synthetic cannabinoids at the cannabinoid cb1 and CB2 Receptors. TIAFT2015 (2015.8, Italy, Florence).
- 9) 花尻(木倉)瑠理: 危険ドラッグの実態と対策. 日本分析化学会第 64 年会シンポジウム(2015.9, 福岡).
- 10) 花尻(木倉)瑠理: 危険ドラッグの「危険性」をどう評価するか? 衛生薬学・環境トキシコロジー

- ーフォーラム2015(2015.9, 神戸).
- 11) 花尻(木倉)瑠理:危険ドラッグ流通実態調査における質量分析の役割, 第40回日本医用マスペクトル学会年会(2015.9, 浜松).
 - 12) 松本紗里, 高須翔志郎, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 前橋恭子, 岩楯公晴:血液中から危険ドラッグ成分が検出され, 高度冠動脈狭窄を認めた若年男性2症例. 日本法医学会第84回学術関東地方集会(2015.10, 東京).
 - 13) Yukari Shigemoto-Mogami, Kaoru Sato, Kazue Hoshikawa, Ruru Kikura-Hanajiri, Takashi Hakamatsuka, Yuko Sekino: Evaluation of drug-induced CB2 cannabinoid receptor activity in the CNS using the ERK1/2 phosphorylation pathway of microglial cells. CBI学会2015(2016.10, 東京).
 - 14) 花尻(木倉)瑠理:危険ドラッグによる被害を防ぐために. 平成27年度関西広域連合危険ドラッグ担当者研修会特別講演(2015.11.2, 大阪).
 - 15) 花尻(木倉)瑠理:危険ドラッグの流通実態の変化. 第52回日本犯罪学会総会特別講演(2015.11.30, 福岡).
 - 16) 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 浅川 和宏¹, 堤 泰造¹, 袴塚高志:平成26年~27年度新規流通危険ドラッグ成分の同定 第52回全国衛生化学技術協議会年会(2015.12, 静岡).
 - 17) 河村 麻衣子, 内山 奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚 高志:平成26年度危険ドラッグ製品の全国買い上げ調査について 第52回全国衛生化学技術協議会年会(2015.12, 静岡).
 - 18) 緒方潤, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:DNA情報を用いた幻覚性植物の鑑定事例. 第52回全国衛生科学技術協議会年会(2015.12, 静岡).
 - 19) 花尻(木倉)瑠理:SFE/SFCを用いた生体試料中乱用薬物の分析について. 第14回SFC研究会(2016.2, 東京).
 - 20) 内山奈穂子, 有竹浩介, 花尻(木倉)瑠理, 裏出良博, 袴塚高志:危険ドラッグ製品よりマイナー成分として検出された新規化合物の同定及びマウス自発運動量に及ぼす作用について. 日本薬学会第136年会(2016.3, 横浜).
 - 21) 河村 麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚 高志:イオンモビリティ質量分析による生体試料中の危険ドラッグ成分スクリーニング分析法の検討. 日本薬学会第136年会(2016.3, 横浜).
 - 22) 田中理恵, 河村麻衣子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志:危険ドラッグのDART-Orbitrap MSを用いた迅速スクリーニング法の検討. 日本薬学会第136年会(2016.3, 横浜).
 - 23) 李 任時, 石井祐次, 武田知起, 山田英之:ヘロイン慢性投与がマウス脳メタボロームに及ぼす影響. 日本薬学会第136年会(2016.3, 横浜).
- ## 2. 論文発表
- 1) Uchiyama N., Asakawa K. 2, Kikura-Hanajiri Ruri, Tsutsumi T., Hakamatsuka T.: A new pyrazole-carboxamide type synthetic cannabinoid AB-CHFUPYCA [N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide] identified in illegal products. *Forensic Toxicol.* 33: 367-373. (2015).
 - 2) Irie T., Kikura-Hanajiri R., Usami M., Uchiyama N., Goda Y., Sekino Y.: MAM-2201, a synthetic cannabinoid drug of abuse, suppresses the synaptic input to cerebellar Purkinje cells via activation of presynaptic CB1 receptors. *Neuropharmacology.* (2015) 95:479-91.
 - 3) Uchiyama N., Shimokawa Y., Kikura-Hanajiri R., Demizu Y., Goda Y., Hakamatsuka 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. *Forensic Toxicol.* 33: 244-259 (2015).
- 4) Toyo'oka T., Kikura-Hanajiri R.: A Reliable Method for the Separation and Detection of Synthetic Cannabinoids by Supercritical Fluid Chromatography with Mass Spectrometry, and Its Application to Plant Products. *Chem Pharm Bull*, 2015;63(10):762-9.
- 5) Fuchigami Y., Fu X., Ikeda R., Kawakami S., Wada M., Kikura-Hanajiri R., Kuroda N., Nakashima K.: Evaluation of the neurochemical effects of methoxetamine using brain microdialysis in mice. *Forensic Toxicol.* 2015;33(2):374-379.
- 6) Kudo K., Usumoto Y., Kikura-Hanajiri R., Sameshima N., Tsuji A., Ikeda N.: A fatal case of poisoning related to new cathinone designer drugs, 4-methoxy PV8, PV9, and 4-methoxy PV9, and a dissociative agent, diphenidine. *Leg Med.* 2015;17(5):421-6.
- 7) Piao Y. S., Hall F. S., Moriya Y., Ito M., Ohara A., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., Lesch K. P., Murphy D. L., Uhl G. R., Sora I.: Methylone-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. *Behav Pharmacol.* 2015;26(4):345-52.
- 8) 花尻(木倉)瑠理:危険ドラッグの流通実態の把握と流通予測. *公衆衛生*, 2015;79(4):255-258.
- 9) 栗原正明:危険ドラッグ規制の戦略, *日本薬理学会雑誌*, 146, 315-320(2015)
- 10)Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Hakamatsuka T.: A phenethylamine derivative 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-*N*-[(3,4-methylenedioxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-NB34MD) and a piperazine derivative 1-(3,4-difluoromethylenedioxybenzyl)piperazine (DF-MDBP), newly detected in illicit products. *Forensic Toxicol.* 34, 166–173 (2016).
- 11)花尻(木倉)瑠理:「危険ドラッグ」とは、その検出事例の変遷. *医薬ジャーナル*, 52(2), 57-60 (2016).
- G. 知的所有権の取得状況
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

分担研究課題: 危険ドラッグ等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

研究分担者: 花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

—危険ドラッグ製品の DART-Orbitrap MS を用いた迅速スクリーニング法の検討—

研究協力者: 田中理恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨: 危険ドラッグ製品の迅速スクリーニング法の構築を目的として, DART イオン源に Orbitrap MS をつなげた DART-Orbitrap MS による危険ドラッグ製品の分析を検討した。

最初にスクリーニング分析の対象とした指定薬物とその関連化合物を中心とする標準試薬の MS/MS スペクトルを測定し, データ解析ソフトウェア TraceFinder3.2 のライブラリを構築した。次に GC-MS, LC-MS 分析で危険ドラッグ成分の含有を確認済みの製品について DART-Orbitrap MS で測定した。試料溶液をステンレスメッシュ上にそれぞれ 2 μ L 塗布して風乾させ, DART 連続分析用モジュールにセットして測定を行なった。TraceFinder3.2 でスクリーニング対象化合物の精密質量, 同位体パターン, MS/MS スペクトルのフラグメントイオン, 作成したライブラリの MS/MS スペクトルとのマッチングをもとに危険ドラッグ製品中の成分の検出を行なった。解析の結果, 乾燥植物細片, 液体製品及び粉末製品とも含有される化合物の検出が可能であることがわかった。

今回検討した DART-Orbitrap MS を用いたスクリーニング法では簡便な前処理で, LC-MS や GC-MS に比べ非常に短時間で効率良く危険ドラッグ製品に含まれる薬物の分析を行うことができるため, このスクリーニング法は非常に有用な方法だと考えられる。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

河村麻衣子

程を含むため, 特に一度に多くの危険ドラッグ製品を分析する場合に時間がかかることが問題である。

A. 研究目的

いわゆる脱法ドラッグ, 違法ドラッグ, 脱法ハーブなどと言われてきた危険ドラッグに含有される化合物は次々と構造類似化合物が作られ, 2000 年頃に世間に登場してから 2016 年 2 月末までに指定薬物となったものだけで 2335 もの化合物が存在する。

現在, これら危険ドラッグ製品のスクリーニング法として GC-MS, LC-MS が広く使われている。これらの方法では前処理やカラムによる分離の過

リアルタイム直接分析 DART (Direct Analysis in Real Time) イオン化法¹⁾は近年開発されたイオン化法で, ヘリウムガスをニードル電極の放電でプラズマ化し, 励起状態の中性気体分子として大気ガス中に放出させると, 測定対象物に直接作用しイオン化することができる方法である。真空下でイオン化を行なう従来の方法と異なり大気圧下でイオン化を行なうので, 試料表面上でイオン化を直接行うことが可能である。すなわちイオン源にサンプルをかざすだけで前処理せずに直接分析を行うことができる。