

ミン系の化合物 3C-E, Allylescaline, bk-2C-B, 2-Methoxy-4,5-methylenedioxy methcathinone, 25I-NBMD, 25I-NB34MD の 6 種類及びトリプタミン系の化合物 5-MeO-DMT, 5-MeO-2-TMT, 4-OH-MET, 4-AcO-MET, 4-OH-DIPT, 4-AcO-DIPT, 4-OH-MIPT, 4-AcO-MIPT, DMT, Psilocin, 4-AcO-DMT, Psilocybin, 4-OH-DET, 4-AcO-DET, 4-AcO-DALT, Bufotenine (5-OH-DMT) の 16 種類の構造を figure. 2 に示した。

2) GPCRs を介した活性評価 (Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay)

ヒト 5HT_{2A} 受容体, G タンパク質 (G_{α16}), Apoaequorin を発現する CHO-K1 細胞 (5HT_{2A} AequoScreen cell line, Perkin Elmer) を 3×10⁵ cells/ml となるようにアッセイ用培地 (フェノールレッドを非含有, 0.1% BSA, 15 mM HEPES 含有 DMEM/HAM's F12) 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 3~10 時間緩やかに攪拌し (11 時間以上攪拌したものは使用しない), その後 3 倍希釈した細胞懸濁液 (1×10⁵ 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。

各化合物のサンプル調製は, 測定開始一時間前にアッセイ用培地を用いて各化合物の 10 段階の希釈系列を作成し (各プレートに n=3 以上), 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) で測定した。プレート毎にポジティブコントロール物質として TCB-2, バックグラウンドとしてアッセイ用培地のみ, 最大反応量として定義する Digitonin (Sigma-Aldrich) の発光強度を同時に測定した。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, Digitonin 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 軸にプロットして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 (Prism Software) を用いて算出した。各分析は Z'factor が 0.6 以上となる精度で行い, 各化合物あたり 2 回以上 (プレート 2 枚以上) 測定し, その平均値を EC₅₀ として示した。複数回測定における各化合物薬理活性の分析値は, 各回 EC₅₀ 値のレンジが log 換算値 ±0.5 以内を有効とし, それ以上の値が出た場合は再測定を行い, 外れ値を棄却した。

C. 研究結果

Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay によって得られた 5HT_{2A} 受容体と各化合物の用量反応曲線及び EC₅₀ 値を figure. 3, 4 と Table 1 に示した。5HT_{2A} 受容体アゴニストのポジティブコントロールとして用いた TCB-2, DOI の EC₅₀ は 0.58 nM, 0.49 nM と同程度の活性を示し, 良好な反応曲線を示した。フェネチルアミン系化合物について, 昨年度報告した Allylescaline, 3C-E, bk-2C-B, 2-Methoxy-4,5-methylenedioxy methcathinone に加え, 本年度は活性既知だが未規制の化合物である 25I-NBMD とその構造異性体の 25I-NB34MD について調べ, それぞれ EC₅₀ は 22.7 nM, 86.5 nM, 334 nM, N.D, 2.89 nM, 29.9 nM であった。トリプタミン系化合物については, DMT, OH 基誘導体 6 種 [Psilocin (4-OH-DMT), Bufotenine (5-OH-DMT), 4-OH-MET, 4-OH-DET, 4-OH-MIPT, 4-OH-DIPT], AcO 基誘導体 6 種 (4-AcO-DMT, 4-AcO-DALT, 4-AcO-MET, 4-AcO-DET, 4-AcO-MIPT, 4-AcO-DIPT), Psilocybin (4-PO-DMT), 5-MeO-DMT, 5-MeO-2-TMT について調べ, それぞれ EC₅₀ が 8.8 nM, 7.41 nM, 4.75 nM, 9.63 nM, 65.4 nM, 13.2 nM, 28.2 nM, 49.9 nM, 247 nM, 76.7 nM, 220 nM, 41.9 nM, 229 nM, 254 nM, 9.14 nM, 62.6 nM であった。

D. 考察

新たに測定したフェネチルアミン系化合物 25I-NBMD とその異性体 25I-NB34MD では、アゴニスト活性が約 10 倍異なる結果であった。

トリプタミン系化合物の 4-OH 基誘導体と 4-AcO 基誘導体の 5HT_{2A} 受容体活性を比較すると、全体的に 4-AcO 基誘導体の活性が弱く、EC₅₀ 値が 3~8 倍の値であった。なお、今回測定した 4-AcO 基誘導体の試験溶液中において、0.5-1.5%程度 の 4-OH 基誘導体が認められている。従って、試験溶液中に少量混在していた 4-OH 基誘導体の活性が、4-AcO 体の測定値に影響を及ぼしている可能性があるが、混在量を考慮すると、4-AcO 基誘導体自体にも 5HT_{2A} のアゴニストがあることが推測された。また、AcO 基誘導体は生体内で速やかに活性の強い OH 基誘導体へ代謝されることから⁹⁾、プロドラックとしての危険性を秘めていると考えられる。4-OH 基誘導体では、DMT (8.8 nM) > MET (9.63 nM) > MIPT (13.2 nM) > DIPT (28.2 nM) > DET (65.4 nM) , 4-AcO 基誘導体では MIPT (41.9 nM) > DMT (49.9 nM) > MET (76.7 nM) > DET (220 nM) > DIPT (229 nM) > DALT (247 nM) の順に受容体活性が強かったことから、トリプタミン骨格の末端アミンに修飾されるアルキル鎖が長く嵩高いほど受容体との結合を阻害し、結果的に活性が弱くなると考えられた。DMT 間で比較すると、Bufotenine (5-OH-DMT) (4.75 nM) > Psilocin (4-OH-DMT) (7.41 nM) ≒ DMT (8.8 nM) ≒ 5-MeO-DMT (9.14 nM) > 4-AcO-DMT (49.9 nM) > Psilocybin (4-PO-DMT) (254 nM) の順で活性が強かった。4 位及び 5 位の OH 基と 5 位の MeO 基は活性に大きな影響を与えなかったが、4 位に AcO 基やさらに嵩高い PO 基を付加すると活性が大きく低下したことから、4 位に嵩高い基が導入されると受容体との結合が阻害されると考えられた。5-MeO-2-TMT は、指定薬物 5-MeO-DMT より約 1 桁 EC₅₀ が大きかったことから、インドール基の 2 位にメチル基がつくことで 5HT_{2A} 受容体との結合が阻害される

と考えられた。

上述した構造活性相関的知見と *in vivo* 系で得られたデータとの相関性について調査することで、薬理活性と生体への影響をより精度よく予測することが期待できる。今後は、5HT_{2A} 受容体以外の受容体と各化合物の活性を調査し、データを蓄積していくことで、*in vivo* 系との相関の信頼性を高めていく必要があると考えられる。

E. 結論

ヒトセロトニン(5HT_{2A})受容体と Aequorin を安定的に共発現する市販の組換え細胞を用い、指定薬物の活性既知化合物に加え、活性未知の新規流通危険ドラッグ成分である化合物など計 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相対的に評価した。その結果、今回測定した新規流通化合物について、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。以上より、危険ドラッグ成分に関して、構造活性相関の新規知見を蓄積した。

F. 参考文献

- 1) 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 Ca²⁺ functional assay による GPCR 活性評価法の検討」花尻(木倉)瑠理
- 2) 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 Ca²⁺ functional

assay による GPCR 活性評価法の検討」日本薬学会第 128 年会発表要旨

- 3) 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 Ca²⁺ 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
- 4) 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)「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
- 5) 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」(H27-医薬 A-一般-003)」平成 27 年度分担研究報告「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

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, 日本法中毒学会 第 34 年会, 福岡 (2015.6).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

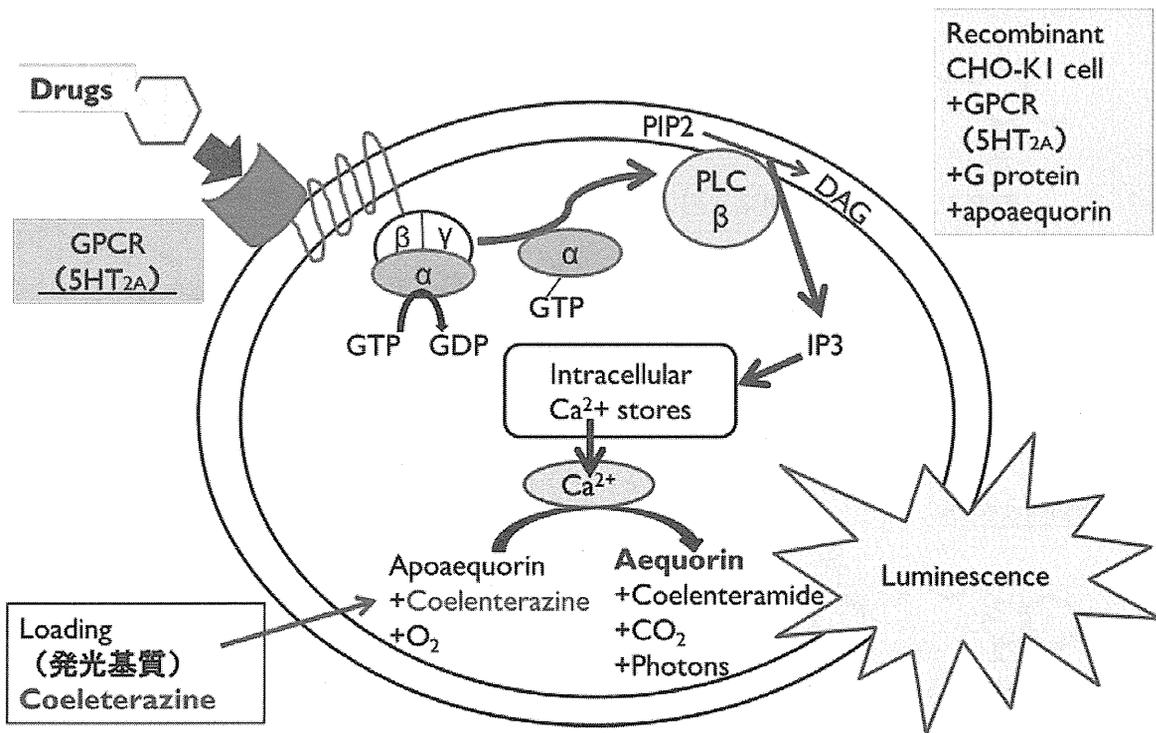
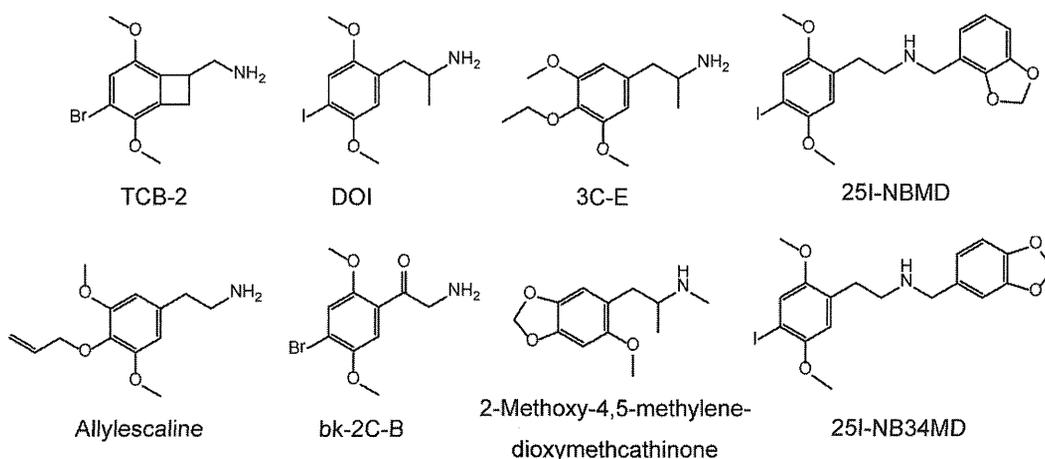


Figure 1. The schematic diagram of Aequorin/GPCRs cell-based Ca^{2+} assay system

Phenethylamine or cathinone series



Tryptamine series

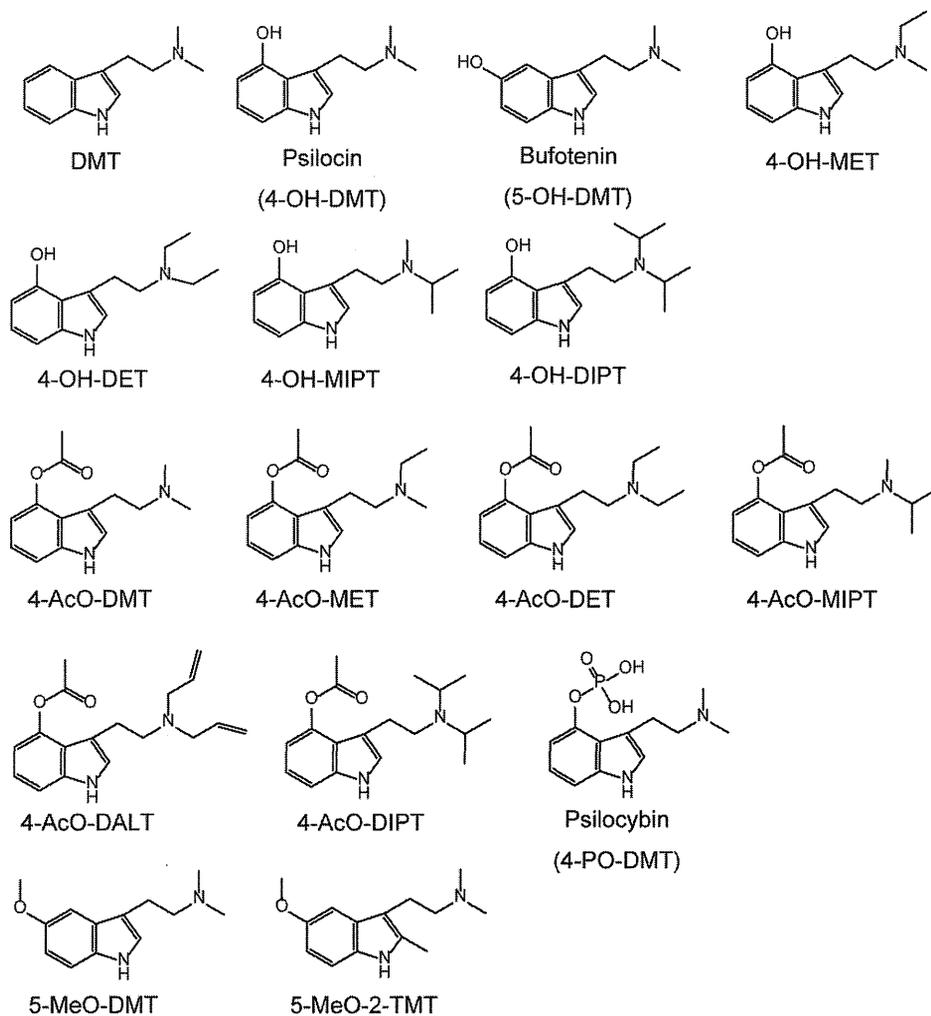


Figure 2. Chemical structures of 5HT_{2A} receptor agonists or target substances investigated in the study

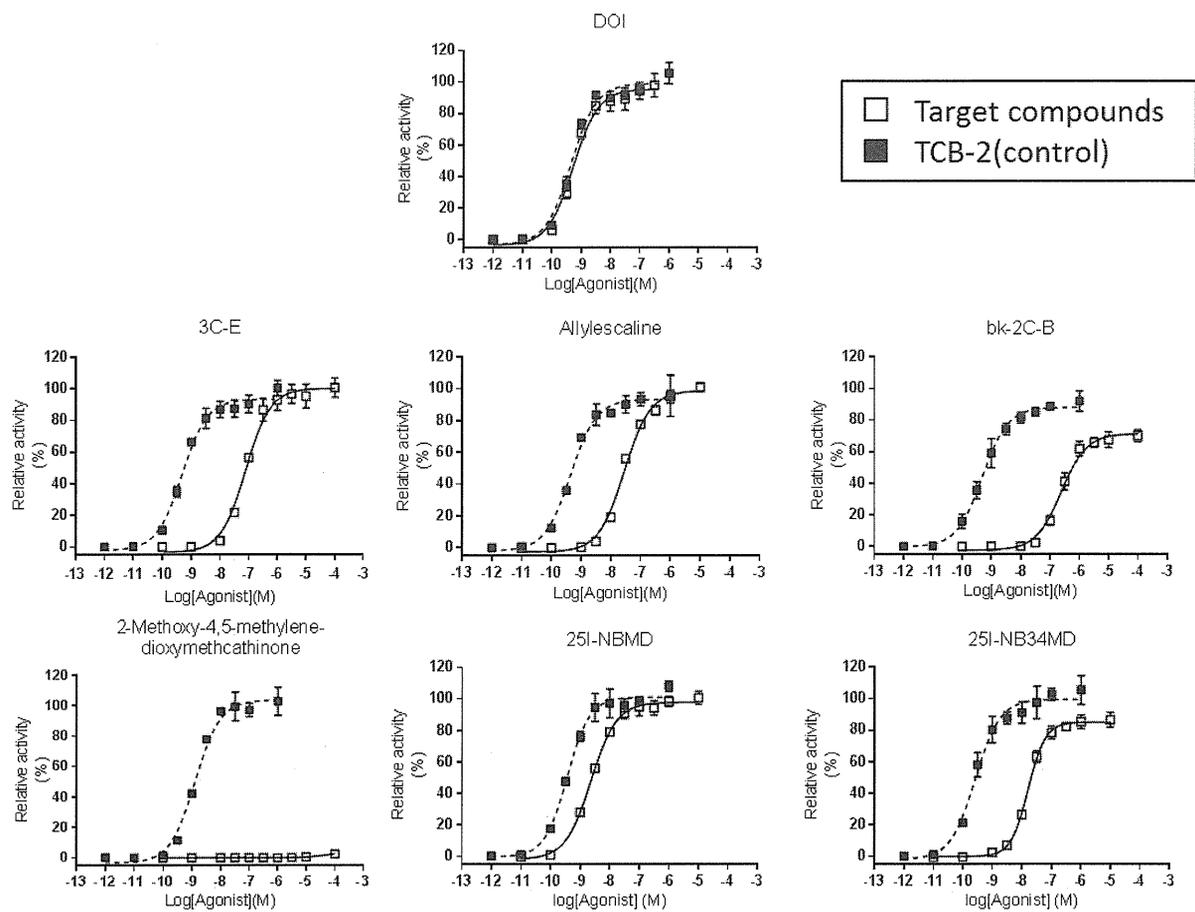


Figure 3. Phenethylamine or cathinone series (agonists) dose response curve at 5HT_{2A} receptor in Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay.

The representative data were shown. TCB-2 was used as an agonist control.

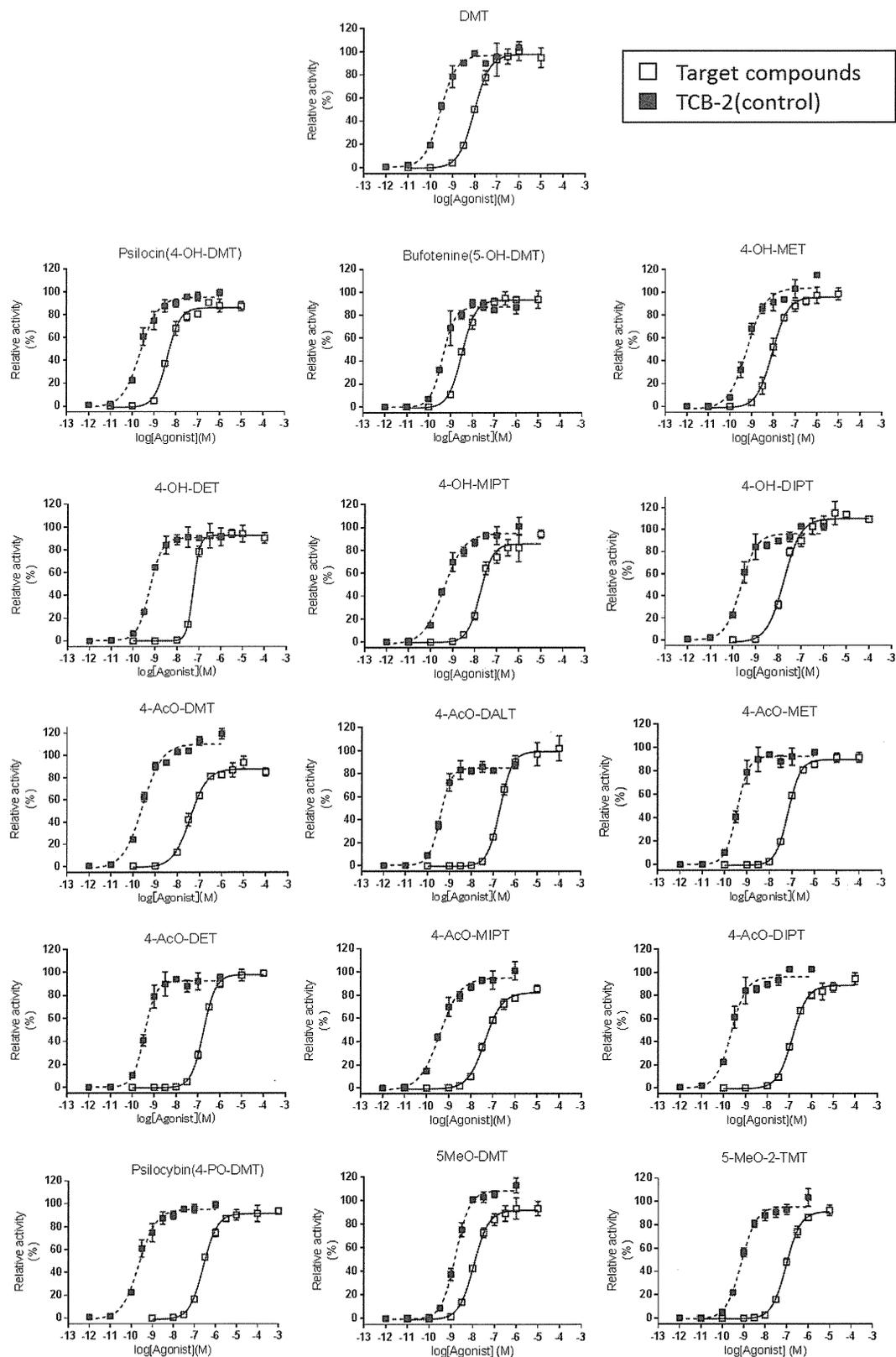


Figure 4. Tryptamine series (agonists) dose response curve at 5HT_{2A} receptor in Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay.

The representative data were shown. TCB-2 was used as an agonist control.

Table 1. EC₅₀ values of each compound for Aequorin/GPCRs cell-based Ca²⁺ functional assay

	Compound name	EC ₅₀ (nM)
Positive control	TCB-2	0.58
	DOI	0.49
Phenethylamine or Cathinone series	3C-E	86.5
	Allylescaline	22.7
	bk-2C-B	334
	2-Methoxy-4,5-methylene- dioxymethcathinone	N.D
	25I-NBMD	2.89
	25I-NB34MD	29.9
Tryptamine series	DMT	8.8
	Psilocin (4-OH-DMT)	7.41
	Bufotenine (5-OH-DMT)	4.75
	4-OH-MET	9.63
	4-OH-DET	65.4
	4-OH-MIPT	13.2
	4-OH-DIPT	28.2
	4-AcO-DMT	49.9
	4-AcO-DALT	247
	4-AcO-MET	76.7
	4-AcO-DET	220
	4-AcO-MIPT	41.9
	4-AcO-DIPT	229
	Psilocybin (4-PO-DMT)	254
5-MeO-DMT	9.14	
5-MeO-2-TMT	62.6	

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

－新規流通危険ドラッグ 4-AcO-DET の代謝に関する研究－

研究協力者：簾内 桃子 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

研究要旨：ヒト肝マイクロソーム画分を用いて新規流通トリプタミン系危険ドラッグ 4-AcO-DET の代謝的検討を行った。その結果、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 bis(4-nitrophenyl) phosphate 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あり、注意が必要である。

研究協力者

河村 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

A. 研究目的

平成 15 年頃より、トリプタミン構造の側鎖のエチルアミンに様々なアルキル基が導入された化合物やインドール骨格の 5 位にメキシ基が導入された化合物等が次々と危険ドラッグ市場に登場した。これらは、神経伝達物質であるセロトニン、また、すでに麻薬として規制対象となっている幻覚成分 *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) や幻覚きのこ(マジックマッシュルーム)の活性成分サイロシン、サイロシビンの構造類似化合物であり、主にセロトニン受容体に作用する幻覚剤である¹⁾。「フォクシー(FOXY)」の名称で違法ドラッグ市場に広く流通し、死亡例を含む健康被害が報告され大きな社会的問題となった *N,N*-Diisopropyl-5-

methoxytryptamine (5-MeO-DIPT) も同じグループに含まれるが、5-MeO-DIPT と 3-(2-Amino propyl)indole (AMT) は平成 17 年にすでに麻薬に指定され、現在では厳しく規制されている。また、平成 19 年 4 月には、指定薬物として、11 種類のトリプタミン系化合物が規制された。その後、日本における危険ドラッグ流通の主流は、カチノン類や合成カンナビノイドに移行し、トリプタミン系化合物の流通は激減した。しかし、平成 26 年から 27 年にかけて、包括指定により規制が厳しくなったカチノン類や合成カンナビノイドに替わり、4 位に水酸基やアセトキシ基が導入されたトリプタミン系化合物が次々と危険ドラッグ市場に再び登場した。これら化合物の代謝についての報告はなく、代表的な化合物の生体内変換の特徴を明らかにする事が出来れば、類似構造を有する薬物が生体に摂取された場合、毒性を予測する上で有用な知

見となりうる事が期待される。

本研究では、新規流通危険ドラッグ成分として、4 位にアセトキシ基を有する 4-Acetoxy-*N,N*-diethyl tryptamine (4-AcO-DET) を選択し、ヒト肝ミクロソーム画分を用いて、代謝的検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬

4-Acetoxy-*N,N*-diethyltryptamine fumarate (4-AcO-DET),
N,N-diethyl-4- hydroxytryptamine (4-OH-DET),
および 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) は、いずれも国立医薬品食品衛生研究所で所有しているものを使用した。
β-NADPH 4 ナトリウム還元型(オリエンタル酵母) および Bis(4-nitrophenyl) phosphate; (BNPP; Sigma-Aldrich) はそれぞれ市販品を使用した。
その他の試薬は、特級および LC-MS グレードのものを使用した。遠心用膜フィルターは Ultrafree-MC (Durapore PVDF 0.45μm, Millipore 社製) を使用した。

2) ヒト試料

ヒト肝ミクロソーム (150-donor pool, Catalog No. 452117; 20 mg/mL) は、Corning 社 (Woburn, MA, USA; 旧 BD Gentest) より購入した。

3) アッセイ方法

ヒト肝ミクロソームを用いた代謝反応では、全量が 200 μL あるいは 500 μL となるように反応溶液を調製した。

<反応溶液>

- Potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4)
- NADPH generating system (10 mM NADPH)
- 4-AcO-DET (0.001 – 200 μM)
- ヒト肝ミクロソーム (0.002 – 500 mg protein/mL)

反応溶液における最終ジメチルスルフォキシド (DMSO) 濃度が 0.1% となるように、基質 (4-AcO-DET) を DMSO に適宜溶解して使用した。反応溶液に、肝ミクロソーム溶液を加えることにより反応を開始し、37°C において反応させた。反応

液に 10 μM の 5-MeO-DMT (IS) を含むアセトニトリル溶液を同量加え、攪拌することにより反応を停止した。反応溶液中における 4-AcO-DET の化学的分解による影響を排除するために、コントロール試料として反応終了後に肝ミクロソーム溶液を加え、同様に処理したものを用いた。反応を終了させた溶液を膜フィルターで遠心ろ過し、ろ液をアセトニトリルで希釈して LC-MS/MS の測定用試料とした。なお、カルボキシルエステラーゼ活性の測定は、Jie Wang 等の方法²⁾により実施した。それぞれの測定は n=3 あるいは n=2 にて行った。

4) LC-MS/MS 分析条件

対象化合物の保持時間、MS/MS 分析の各条件等を Table 1 に示した。

<システム>

UPLC-MS/MS : Acquity I-class UPLC / Xevo-TQ-S (Waters)

<LC 条件>

Column : CORTECS C18 column, 2.7 μm, 2.1 mm×150 mm, CORETECS C18 Vanguard column, 2.7 μm, 2.1 mm×5 mm, Mobile phase : 0.1% Formic acid / CH₃CN with 0.1% Formic acid, 95 : 5–20:80 (10 min, 2 min hold), Flow rate : 0.3 mL, Column temp. : 40°C, Injection volume : 1 μL

<質量分析条件>

Ionization : EI, positive, Capillary voltage : 2.0 kV, Source temp. : 150°C, Desolvation Temp. : 500°C
Cone Gas Flow : 150 L/hr, Desolvation Gas Flow : 1000 L/hr, Collision gas flow : Ar, 0.15 mL/min

5) 検量線の作成

反応溶液のコントロール試料 (肝ミクロソームもしくはヒト代謝酵素溶液の代わりに buffer を添加) について、4-AcO-DET もしくは 4-OH-DET が 0-200 μM となるようにそれぞれ調製した。10 μM の 5-AcO-DMT (IS) を含むアセトニトリル溶液を同量加えて、アッセイ方法に記載している方法で分析を行い、IS に対する薬物のピーク面積比から検量線を作成した。

(倫理面の配慮)

ヒト肝ミクロソームは、個人情報 が 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。

C. 結果

1) 各試料の分析における検量線について

4-AcO-DET および 4-OH-DET の各試料溶液は、10 倍希釈液で 0.05-10 μM の濃度範囲、200 倍希釈液で 1-200 μM の濃度範囲で直線性が認められた ($r^2 > 0.999$)。

なお、コントロール試料において、反応溶液中における 4-AcO-DET および 4-OH-DET の分解を確認したが、アッセイ時間中においては、これら化合物の化学的分解は認められなかった。

2) ヒト肝ミクロソームによる反応

はじめに、ヒト肝ミクロソームにより、4-AcO-DET がどのような化合物に変換されるか、予備的検討を行った。NADPH 存在下、ヒト肝ミクロソームを用いて 4-AcO-DET の代謝産物を検討した結果、反応溶液からは、主に 4-OH-DET が検出された。Fig. 1 に、NADPH 存在下、十分量のヒト肝ミクロソーム (0.20 mg/mL) による 4-AcO-DET (200 μM) の代謝的分解を検討した結果、および 4-OH-DET への変換量を反応 30 分間にわたり検討した結果を示した。

ヒト肝ミクロソームにより 4-AcO-DET 量は反応時間と共に減少し、反応 10 分後には 4-AcO-DET の残存量は添加時の 3% まで減少した。一方、4-AcO-DET の減少に対し基質の 97 % が 4-OH-DET 体として検出された。これらの結果から 4-AcO-DET は、ヒト肝ミクロソーム画分中の酵素により、極めて速やかに O-脱アセチル化を受け、そのほとんどが 4-OH-DET に変換されることが明らかとなった。

3) 4-AcO-DET 脱アセチル化に及ぼす電子伝達系の影響

4-AcO-DET 脱アセチル化に寄与する肝ミクロソーム中の酵素を明らかにするための検討を行った。予備検討で 4-AcO-DET の脱アセチル化を担う酵素の比活性は CYP 酵素の比活性に比べ、極めて高いことが推察されたため、CYP 酵素以外の関与についても検討した。まず、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、4-AcO-DET の脱アセチル化に及ぼす NADPH の効果について検討した。

ヒト肝ミクロソーム (0.016-0.200 mg/mL) に 4-AcO-DET (200 μM) を添加し、反応 3 分間における 4-AcO-DET の脱アセチル化活性に及ぼす NADPH の添加効果について検討した結果を Fig. 2 に示す。

NADPH 存在下、4-OH-DET はミクロソームタンパク濃度 (0.016 - 0.100 mg/mL) の増加に比例して生成量が増加した。一方、NADPH 非存在下においても、ミクロソームタンパク濃度 (0.016-0.200 mg/mL) の増加に伴い 4-OH-DET の生成量が増加した。低タンパク濃度 (0.002-0.016 mg/mL) においても、4-OH-DET 体の生成量とタンパク濃度との間には相関性が見られた (Data is not shown)。また、双方の系において大きな差は認められなかった。本結果から、4-AcO-DET の脱アセチル化は、NADPH に非依存的な反応であることが明らかとなった。

なお、4-AcO-DET 脱アセチル化酵素の比活性は、基質 200 μM 濃度において 140-180 nmol/min/mg protein を示し、同一ロットのヒト肝ミクロソームにおける CYPs による標準基質に対する活性値 (100-2000 pmol/min/mg; Corning 添付文書) と比較し、極めて高いことが認められた。

4) カルボキシエステラーゼ阻害剤が 4-AcO-DET の脱アセチル化に及ぼす影響

4-AcO-DET の脱アセチル化には、NADPH-電子伝達系に依存する CYP 酵素群ではなく、ヒト肝ミクロソーム画分中に存在するエステラーゼの 1 種であるカルボキシルエステラーゼ等の関与が推測

された。その特異的阻害剤である 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検討した。

ヒト肝ミクロソーム画分による 4-AcO-DET の脱アセチル化へ及ぼす阻害剤 BNPP の効果について検討した結果を Fig. 3 に示す。BNPP 濃度の増加に伴い、4-AcO-DET 脱アセチル化活性は減少し、BNPP 10 μ M において、活性の 92%が、100 μ M では 96%が阻害された。2 回実施した試験 (Exp.1 および Exp.2) において、それぞれの阻害曲線は、ほぼ重なりあうことが認められた。Exp.1 の阻害曲線を Fig. 3 A) に、両阻害実験の数値結果を Fig. 3 B) に示す。IC₅₀ 値はそれぞれの実験の平均値 (n=2 および n=3) を記した。Exp. 1 の IC₅₀ 値は 0.905 μ M を、Exp. 2 では、1.033 \pm 0.189 μ M であり、2 回の実験の平均 IC₅₀ 値は、0.969 μ M を示した。

以上の結果から、4-AcO-DET の脱アセチル化を担う酵素は、カルボキシエステラーゼであることが明らかとなった。

D. 考察

別途実施した研究において、トリプタミン系化合物の 4-OH 誘導体 (4-OH-DMT, 4-OH-MET, 4-OH-DET, 4-OH-MIPT, 4-OH-DIPT) と 4-AcO 誘導体 (4-AcO-DMT, 4-AcO-MET, 4-AcO-DET, 4-AcO-MIPT, 4-AcO-DIPT) の 5HT_{2A} 受容体アゴニスト活性を検討した結果、4-AcO 誘導体よりも 4-OH 誘導体はアゴニスト活性が強く、4-OH 誘導体の EC₅₀ 値は 4-AcO 誘導体の 1/3~1/8 倍の値であった³⁾。実際、4-AcO-DET と 4-OH-DET においても、それぞれ 5-HT_{2A} 受容体アゴニスト活性は、EC₅₀ 値で 220 nM と 65.4 nM を示し、4-OH-DETの方が 3.4 倍程度強いアゴニスト活性を示した。以上の結果を考慮すると、4-AcO-DET は、肝ミクロソームにおいて、代謝活性化されることが明らかとなった。

本研究では、4-AcO-DET を対象として検討を行ったが、危険ドラッグ市場には、その他にも構

造類似の 4-AcO 誘導体が危険ドラッグとして流通している。これらの化合物を摂取した場合、生体内のカルボキシエステラーゼによってより活性が強い 4-OH 誘導体に速やかに変換することが推測され、注意が必要であると考えられた。カルボキシエステラーゼは、肝のみならず小腸、腎臓、肺への分布が知られている。トリプタミン系の危険ドラッグ製品の多くは経口的に摂取されることが推測されており、生体内変換を考慮する上で、ヒト小腸のミクロソームが 4-OH-DET 体への変換においてどのような役割を担っているのか、今後の課題といえる。

構造類似化合物である 5-Methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) は、天然に存在する幻覚性トリプタミン類として知られているが (化学合成化合物は平成 19 年 4 月 1 日より指定薬物として規制)、本化合物は主にモノアミンオキシダーゼ A (MAO-A) により酸化的脱アミノ化を受け、不活性化する⁴⁾。一方で、CYP2D6 により O-脱メチル化をうけ、セロトニン 5-HT_{2A} アゴニスト活性が強い bufotenine に代謝される⁴⁾。そのため、これら成分を含む植物を摂取する際は、MAO 阻害活性を有する harmine や harmaline 等の β -カルボリンアルカロイドを含む植物と一緒に摂取し、酸化的脱アミノ化による不活性化を阻害して、効果をより長く得る乱用方法が広く知られている⁴⁾。本研究では、肝ミクロソーム画分中には存在しないモノアミンオキシダーゼ (MAO) による代謝は検討していない。しかし、別途、マウスに 4-AcO-DET を 5 mg/kg 腹腔内投与し 1 時間後の血漿中薬物濃度を測定したところ、4-OH-DET が高濃度検出され、未変化体およびその他の代謝物はほとんど検出されなかった (Data is not shown)。マウスにおいては、4-AcO-DET の MAO による不活性化 (酸化的脱アミノ化) よりも、カルボキシエステラーゼによる活性化 (脱アセチル化による 4-OH-DET の生成) の方が早い可能性が考えられた。

なお、4-AcO-DET からカルボキシエステラーゼにより生成した 4-OH-DET は、肝の抱合酵素に

よりグルクロン酸抱合を受けることが推測されるが (Fig. 4), 本研究においては, アッセイ溶液中にグルクロン酸抱合体の生成は確認されなかった。

E. 結論

新規流通危険ドラッグ 4-AcO-DET について, ヒト肝マイクロソームを使用して代謝試験を実施した。その結果, 4-AcO-DET は, ヒト肝マイクロソーム画分中の酵素により, 極めて速やかに O-脱アセチル化を受け, そのほとんどが 4-OH-DET に変換されることが明らかとなった。また, 阻害実験から, カルボキシルエステラーゼが主に関与していることが明らかとなった。別途実施した研究において, 4-OH 誘導体の方が 4-AcO 誘導体よりも, セロトニン受容体 5-HT_{2A} アゴニスト活性が強いことが明らかとなっていることから, 4-AcO-DET は, 肝マイクロソームにおいて代謝活性化されることが示された。

なお, 4-AcO-DET は平成 27 年 8 月 8 日に, 指定薬物として規制 (施行) された。

F. 参考文献

- 1) D. J. McKenna et al., *J. Psychoact. Drugs*, 16(4), 347-358 (1984).
- 2) J. Wang et al., *Drug Metab. Dispos.*, 39, 1329-1933 (2011)
- 3) 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)「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」平成 27 年度研究分担報告「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アゴニスト活性の評価」(曾我慶介, 蜂須賀暁子, 最上知子)。
- 4) S. Hong-Wu et al., *Curr Drug Metab.* 11(8), 659-666 (2010).

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

特になし。

I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Table 1 MRM mode of UPLC-MS/MS used for the quantitative

Substances	MRM	Cone (V)	Collision (V)	Retention time (min)
4-AcO-DET	275.1 > 202.1 (for quantitative)	10	16	3.6
	275.1 > 86.1 (for qualitative)	10	16	
4-OH-DET	233.1 > 115.1 (for quantitative)	10	36	2.7
	233.1 > 86.1 (for qualitative)	10	18	
5-MeO-DMT (IS)	219.1 > 174.1 (for quantitative)	20	20	2.9
	219.1 > 159.1 (for qualitative)	20	25	

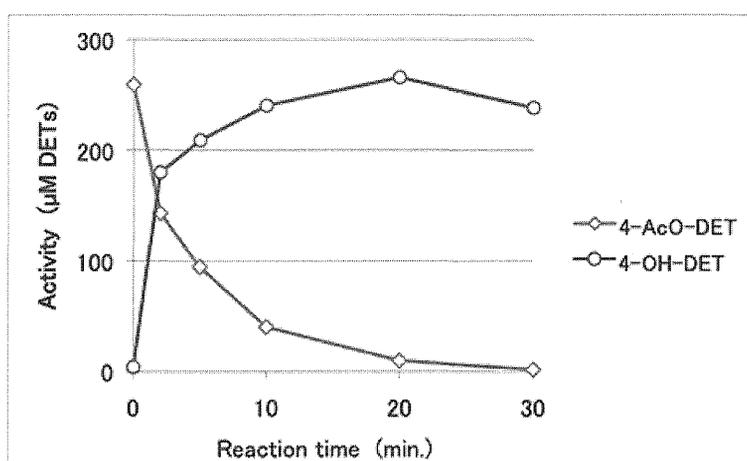


Fig. 1 Time-dependent decrease of 4-AcO-DET and increase of 4-OH-DET generation by human liver microsomes.

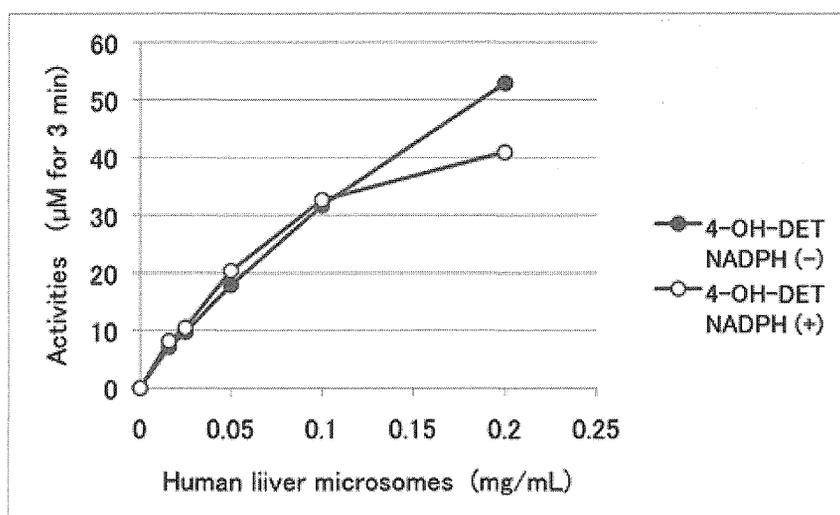
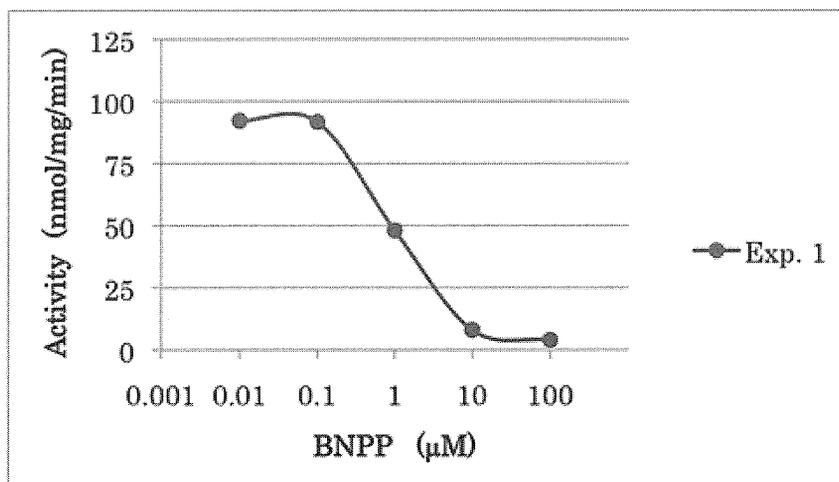


Fig. 2 Effects of NADPH-CYP reductase system on the deacetylation of 4-AcO-DET

A)



B)

		IC ₅₀ (µM)
Average		0.969
Experiment 1	n=2	0.905
Experiment 2	n=3	1.033 ± 0.189

Fig. 3 Inhibitory effects of BNPP on 4-AcO-DET deacetylation by human liver microsomes.

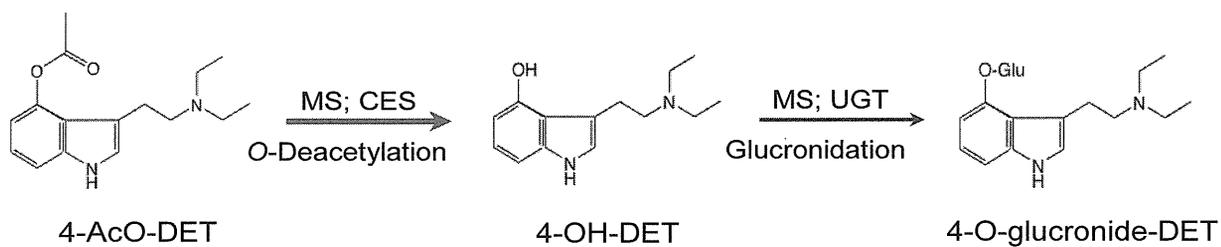


Fig 4 Putative metabolic pathway of 4-AcO-DET and 4-OH-DET in human liver microsomes.

分担研究課題:危険ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定
研究分担者:内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

ー平成 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)ー

研究要旨:昨今,いわゆる「脱法ハーブ」や「リキッドアロマ」などと呼ばれる危険ドラッグ製品の流通が増加しており,これら危険ドラッグに起因すると考えられる健康被害や交通事故等が問題となっている.我々は,危険ドラッグ製品の流通実態調査を継続的に行っており,これまでに 200 種類以上の化合物を危険ドラッグ成分として同定している.

本研究では,平成 27 年度に入手した危険ドラッグ製品中から新規流通危険ドラッグ成分として 3 化合物を同定した.その内訳としては,pyrazole 型の新規合成カンナビノイド:AB-CHFUPYCA (1),フェネチルアミン系化合物:25I-NB34MD (2),ピペラジン系化合物:DF-MDBP (3)を同定した.今回検出された 3 化合物のうち,2 化合物(25I-NB34MD (2), DF-MDBP (3))は,平成 27 年度に指定薬物として規制された.従って,今後も新しい骨格を有する危険ドラッグの流通が懸念されるため,継続的な実態調査を行い,危険ドラッグ製品の分析及び同定が必要と考えられる.

研究協力者

河村 麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部

浅川 和宏 徳島県立保健製薬環境センター
製薬衛生担当 主任

A. 研究目的

近年,いわゆる「脱法ハーブ」や「リキッドアロマ」などと呼ばれる危険ドラッグ製品の流通が増加している.特に,平成 26 年 6 月に東京池袋で発生した危険ドラッグ吸引による危険運転死傷事故など,これら危険ドラッグに起因すると考えられる健康被害や交通事故等が問題となっている.我々は,危険ドラッグ製品の流通実態調査を継続的に行っており,これまでに 200 種類以上の化合物を危険ドラッグ成分として同定している [1-8].厚生労働省では,これら流通の認められた化合物について,随時指定薬物として指定しており,平成 24 年度に施行された合成カンナビノイドの包括指

定(759 化合物)に引き続き,カチノン系化合物についても平成 26 年 1 月及び平成 27 年 5 月に包括指定(474 化合物及び 827 化合物)が施行され,平成 28 年 2 月時点で,2335 化合物+1 植物が指定された.しかし,依然として新たな化合物が危険ドラッグ成分として検出されることが危惧される.

本研究では,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, HR-MS および NMR 分析を行った.その結果,新規流通危険ドラッグ成分として同定した 3 化合物について報告する.

B. 研究方法

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各化合物を単離し,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.

1. 試料及び試薬

主に平成27年度に入手した危険ドラッグ製品乾燥植物細片、粉末、液体等)を分析に供した。このうち、本報告書では、3種類の製品(A-C)中の3化合物(compounds 1-3)のデータについて記載した。製品Aは乾燥植物片、製品B、Cは液体であった。LC-MSの移動相に用いたアセトニトリルはHPLCグレードを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。25I-NBMDはCayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)より購入した。抽出溶液の膜ろ過には、Ultrafree-MC (0.45 µm filter unit, Merck MILLIPORE 社製)を用いた。

2. MS測定用試料の調製法

植物細片はマッシャーで粉末化して10 mg、液体試料は20 µLを使用した。MeOH 1 mLを加えて超音波下10分間抽出を行った後、さらに膜ろ過を行い、不溶物を取り除いて測定試料とした。また、試料は適宜希釈して用いた。

3. GC-MS分析条件

装置:Agilent社製6890N GC及び5975 MSD, カラム:HP-1MS (30 m x 0.25 mm i.d., 膜厚0.25 µm, Agilent社製), キャリアーガス:He, 0.7 mL/min, 注入法:スプリットレス, 注入量:1 µL, 注入口温度:220°C, カラム温度:80°C (1 min hold) - 5°C/min - 190°C (15 min hold) - 10°C/min - 310°C (15 min hold), イオン化法:EI法, トランスファーライン温度:280°C, scan range: m/z 40-550

4. LC-MS分析条件

装置:[UPLC] Waters ACQUITY UPLC/[MS] Waters Single Quadrupole Detector(SQD), カラム:ACQUITY HSS T3 (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.8 µm, Waters), ガードカラム:Van Guard column (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.8 µm, Waters), 移動相A:0.1%ギ酸水溶液, 移動相B:0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件:(1) A/B 65/35-35/65 (0-4 min) -25/75 (4-16 min) -10/90 (16-17 min, 5 min hold), (2) A/B 95/5-80/20 (20 min) -20/80 (30 min, 10 min hold); 測定波長:210-450 nm, 流速:0.3 mL/min, カラム温度:40°C,

注入量:1 µL, 検出:フォトダイオードアレイ検出器(PDA)および質量検出器

*合成カンナビノイドは主に条件(1), その他は条件(2)で測定を行った。

質量分析条件

イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法, Positive and negative mode, Desolvation gas flow: N_2 650 L/h, Desolvation gas temp.:350°C, Cone voltage:30 V, Capillary voltage:2500 V, scan range: m/z 120-650

5. 高分解能MS分析

LC-Q-TOF-MS

装置:TripleTOF® 6600 LC/MS/MS system (AB SCIEX, MA, USA), カラム:ACQUITY HSS T3 (2.1 mm i.d. x 100 mm, 1.8 µm, Waters), ガードカラム:Van Guard HSS T3 (2.1 mm i.d. x 5 mm, 1.8 µm, Waters), 移動相A:0.1%ギ酸水溶液, 移動相B:0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件:A/B 95/5-5/95 (10 min, 2 min hold), 測定波長:210-450 nm, 流速:0.3 mL/min, カラム温度:40°C, 注入量:1 µL, 検出:フォトダイオードアレイ検出器および質量検出器

質量分析条件

イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法, Positive mode; Source temperature, 550°C; gas, N_2 ; ion source gas 1, 50 psi; ion source gas 2, 50 psi; curtain gas, 25 psi; ion spray voltage, 5500 V; declustering potential 80 V; mass spectral range, m/z 100-1000.

6. NMR測定

NMR装置:JEOL製ECA-600またはECA800

測定核種: 1H , ^{13}C , 測定溶媒:chloroform- d_3 (99.96%) and dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 (99.96%) (ISOTEC社製)。

各種NMR (1H -NMR, ^{13}C -NMR, heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), ^{15}N -HMBC, HH correlation spectroscopy (HH-COSY), nuclear Overhauser effect (NOE)) 測

定を行った。

7. Recycle HPLC 分析条件

装置:リサイクル分取 HPLC 日本分析工業製 LC-9201, 検出:UV 検出器および RI 検出器, カラム 1:JALGEL-GS310, 移動相:0.1%ギ酸メタノール, 流速:5 mL/min

8. 分取 HPLC 分析条件

装置: Isorela One (Biotage, Stockholm, Sweden), 検出:UV 検出器, カラム:SNAP KP-sil column (particle size: 50 μ m), SNAP Ultra column (particle size: 25 μ m) 及び SNAP Ultra C18 column (particle size: 25 μ m) (Biotage).

C. 研究結果・考察

分析を行った危険ドラッグ製品の内, 未知の成分が検出された製品から新規流通化合物として 3 化合物(1-3)を単離し, NMR 及び HR-MS により同定した (Fig. 1a). 今回同定した化合物, 既知検出化合物及び関連化合物の構造は Fig. 1a-1c に示し, 危険ドラッグ製品 (A-C) の MeOH 抽出試料の GC-MS, LC-MS データ及び各化合物の 2 次元 NMR データを Fig. 2-6 に示し, 各化合物の NMR スペクトルデータを Table 1-3 に示した.

1. 未知危険ドラッグ成分 (1-3) の単離

1.1. 化合物 1 の単離

植物片試料 (製品 A, 1 g) に CHCl_3 (100 mL) を加え, 10 分間室温で超音波抽出を行った. 抽出操作を 3 回行った後, 抽出液を濃縮, 乾固し, 得られた抽出エキスを Preparative TLC に付し, 展開溶媒 Hexane-AcOEt (3/1, v/v) で分離を行った. TLC プレートの UV254 nm で検出された部分を掻き取り, CHCl_3 で抽出し, 得られた画分をさらに Preparative TLC に付し, 展開溶媒 Isopropylether/acetone/isopropanol (10/1/1, v/v) で分離を行い, CHCl_3 で抽出した. 得られた画分を Acetone で再結晶し, 白色針状結晶として化合物 1 (7 mg) を得た.

1.2. 化合物 2 の単離

液体試料 (製品 B を含む 14 製品, 各約 5 mL) を集めて濃縮した後, 0.1%ギ酸メタノールに溶解させ, フィルター濾過後, Recycle GPLC (カラム 1: JALGEL-GS310, 移動相:0.1%ギ酸メタノール) に付し, 白色固体として化合物 2 (39 mg) を得た.

1.3. 化合物 3 の単離

化合物 3 については, 液体試料 (製品 C, 約 5 mL) をそのまま GCMS, LCMS 分析に用いた. また, 試料を濃縮乾燥後, 直接 NMR 測定に用いた.

2. 未知危険ドラッグ成分の同定

2.1. 未知危険ドラッグ成分 (1) の同定

危険ドラッグ製品 A の MeOH 抽出試料の GC-MS 及び LC-MS 分析のスペクトルデータは Fig. 2 に示した. 両分析の結果, 1 つの未知ピーク (1) が検出された (Figs. 1a, 2a, b, d). 未知ピーク 2 は, GC-MS 分析および LC-MS 分析の結果, それぞれ, m/z 95, 257, 285, 356 and 400 ($[\text{M}^+]$) (Fig. 2e) 及び m/z 401 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) にイオンピークが観測された (Fig. 2c). LC-Q-TOF-MS による化合物 2 の HR-MS 分析では, m/z 401.2344 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ のピークが観測され, 推定組成式は $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2\text{F}$ (calcd. 401.2353) であった.

次に, NMR 分析により化合物 1 の構造解析を行った (Fig. 3, Table 1). ^1H and ^{13}C NMR, HH-COSY, HMQC, HMBC, ^{15}N -HMBC, 1D-NOE スペクトルから, 化合物 1 は, 3 つ部分構造: cyclohexylmethyl group, *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-carboxamide group, 4-fluorophenyl group を有することが示唆された (Table 1, Fig. 3a,b). さらに, 残りの $\text{C}_3\text{H}_1\text{N}_2$ unit は, 1D-, 2D-NMR から pyrazole 基と考えられた (Table 1, Fig. 3a,b). また, HMBC 相関 (H-4 から C-3, C-5, amide carbon (C-1'')) への相関, H-1A から C-5 への相関, H-2'' 及び H-6'' から C-3 への相関が観測された (Fig. 3a). さらに ^{15}N HMBC 相関 (H-4 から N-1 及び N-2 への相関, H-1A から N-2 への相関) が観測された (Fig. 3b). さらに, 1D-, 2D-NMR 及び各種 MS データを総

合し、化合物 1 は、

N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(cyclohexylmethyl)-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide と同定した。本化合物は新規化合物であったため、“AB-CHFUPYCA”と命名した。また、これまで危険ドラッグ製品中から多く検出された indole, indazole 基を有する合成カンナビノイドとは異なり、AB-CHFUPYCA(1)は、pyrazole 基を有する化合物であった。なお、NMR 解析等の詳細は本報告書では割愛するが、研究発表 [1] に記載している。

2.2. 未知危険ドラッグ成分(2)の同定

危険ドラッグ製品 B の MeOH 抽出試料の GC-MS 及び LC-MS 分析のスペクトルデータは Fig. 4 及び 5 に示した。両分析の結果、既知化合物として 1 つのフェネチルアミン系化合物 25E-NBOMe と共に、1 つの未知ピーク(2)が検出された(Fig. 4a, 5a)。未知ピーク 2 は、GC-MS 分析および LC-MS 分析の結果、それぞれ、 m/z 441 ($[M]^+$) 及び m/z 442 ($[M+H]^+$) にイオンピークが観測された(Fig. 4c, 5d)。LC-Q-TOF-MS による化合物 2 の HR-MS 分析では、 m/z 442.0509 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、推定組成式は $C_{18}H_{21}NO_4$ (calcd. 442.0515) であった。従って、化合物 2 の推定組成式 ($C_{18}H_{20}INO_4$: 441) は、2,3-メチレンジオキシ体のフェネチルアミン系化合物 25I-NBMD と同じであり (Fig. 1c), GC-EI-MS のスペクトルパターンは 25I-NBMD 標準品と類似していた(Fig. 4c, 4d)。しかし、製品と標準品を混ぜて分析したところ、各ピークの保持時間が異なっていたことから、化合物 2 は 25I-NBMD ではないことが明らかとなった(Fig. 4b)。次に、LC-MS についても、製品と 25I-NBMD の標準品を混ぜて分析したところ、グラジエント条件(1)では両化合物は分離しなかった(Fig. 5b)。また、化合物 2 及び 25I-NBMD のスペクトルは非常に類似しているため識別が困難であった(Fig. 5d, e)。そこで、0.1% ギ酸水溶液/0.1% ギ酸アセトニトリル = 75/25 のアイソクラティック条件で分析した所、両

者は完全ではないが分離した(Fig. 5c)。

次に、NMR 分析により化合物 2 の構造解析を行った (Table 2, Fig. 3c, d)。比較のために、25INBMD のデータも同時に記載した (Table 2, Fig. 3e)。 1H and ^{13}C NMR, HH-COSY, HMQC, HMBC, ^{15}N -HMBC and 1D-NOE スペクトル及び各種 MS データから、化合物 2 は 3,4-メチレンジオキシ体構造を有するフェネチルアミン系化合物 : 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-*N*-[(3,4-methylenedioxyphenyl)methyl]ethanamine と同定し、25I-NB34MD と命名した (Fig. 1a)。25I-NB34MD (2) は新規化合物であり、化学的または薬理的データは報告されていないが、構造異性体である 25I-NBMD は、既にセロトニン 5HT2A-R に対する親和性を有することが報告されている化合物であった ($K_i = 0.049-0.21$ nM, $EC_{50} = 8.2$ nM) [9, 10]。

危険ドラッグ製品中の成分において、構造異性体が検出される例は過去にもあったが (2-, 3-, 4-fluoromethcathinone など)、今回、既知化合物 25I-NBMD の構造異性体である“25INB34MD”が検出された。従って、特に異性体に関しては、分析の際に標準品との直接比較を行い、同定することが重要であると考えられた (研究発表[2])。

2.3. 未知危険ドラッグ成分(3)の同定

危険ドラッグ製品 (C) の GC-MS 分析および LC-MS 分析の結果、1 つの未知危険ドラッグ成分 (3) が検出された (Fig. 6a, b, d)。LC-Q-TOF-MS による化合物 3 の HR-MS 分析では、 m/z 257.1106 に $[M+H]^+$ のピークが観測され、推定組成式は $C_{12}H_{15}F_2N_2O_2$ (calcd. 257.1096, 1.0 mDa) であった。次に、NMR 分析により化合物 3 の構造解析を行った。1次元、2次元 NMR データ及び各種 MS データを含めた解析から、化合物 3 は、ピペラジン構造を有する

1-(3,4-difluoromethylenedioxybenzyl)piperazine (DF-MDBP) と同定した (Table 3, Fig. 1a, 3f, 6c, 6e)。本化合物は合成の報告はあったが、薬理作用に関する報告はなかった [11]。また、

DF-MDBP (2) は, 指定薬物である 1-(3,4-methylenedioxybenzyl)piperazine [MDBP] のジフルオロ付加体であった。なお, NMR 解析等の詳細は本報告書では割愛するが, 研究発表 [2] に記載している。

D. 結論

本研究では, 平成 27 年度に入手した危険ドラッグ製品中から新規流通危険ドラッグ成分として 3 化合物を同定した。その内訳としては, pyrazole 型の新規合成カンナビノイド: AB-CHFUPYCA (1), フェネチルアミン系化合物: 25I-NB34MD (2), ピペラジン系化合物: DF-MDBP (3) を同定した。

今回検出された 3 化合物のうち, 2 化合物 (25I-NB34MD (2), DF-MDBP (3)) は, 平成 27 年度に指定薬物として規制された。従って, 今後も新しい骨格を有する危険ドラッグの流通が懸念される。故に, 本研究結果は, 既知および新規危険ドラッグを判断する際の有用な科学的データであると考えられる。

なお, 本報告では, 平成 27 年度に入手した危険ドラッグ製品から検出された成分の一部を記載しているが, その他の平成 27 年度新規流通危険ドラッグ成分の同定については, 本報告書で別途報告している [12]。

E. 参考文献

1. Kikura-Hanajiri R, Uchiyama N, Kawamura M, Goda Y (2013) Changes in the prevalence of synthetic cannabinoids and cathinone derivatives in Japan until early 2012. *Forensic Toxicol* 31:44-53
2. Kikura-Hanajiri R, Uchiyama N, Kawamura M, Goda Y (2014) Changes in the prevalence of new psychoactive substances before and after the introduction of the generic scheduling of synthetic cannabinoids in Japan. *Drug Test Anal* 6:832-839
3. Uchiyama N, Matsuda S, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y (2014) Identification of two new-type designer drugs, a piperazine derivative MT-45 (I-C6) and a synthetic peptide Noopept (GVS-111), with a synthetic cannabinoid A-834735, a cathinone derivative 4-methoxy- α -PVP and a phenethylamine derivative 4-methylbuphedrine from illegal products. *Forensic Toxicol*. 32:9-18
4. Uchiyama N, Shimokawa Y, Matsuda S, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y (2014) Two new synthetic cannabinoids, AM-2201 benzimidazole analog (FUBIMINA) and (4-methylpiperazin-1-yl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (MEPIRAPIM), and three phenethylamine derivatives, 25H-NBOMe 3,4,5-trimethoxybenzyl analog, 25B-NBOMe, and 2C-N-NBOMe, identified in illegal products. *Forensic Toxicol* 32:105-117
5. Uchiyama N, Matsuda S, Kawamura M, Shimokawa Y, Kikura-Hanajiri R, Aritake K, Urade Y, Goda Y (2014) Characterization of four new designer drugs, 5-chloro-NNEI, NNEI indazole analog, α -PHPP and α -POP, with 11 newly distributed designer drugs in illegal products. *Forensic Sci Int* 243:1-13
6. Uchiyama N, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y (2013) URB-754: a new class of designer drug and 12 synthetic cannabinoids detected in illegal products. *Forensic Sci Int* 227:21-32
7. Uchiyama N., Shimokawa Y., Kikura-Hanajiri R., Demizu Y., Goda Y., Hakamatsuka T.: A synthetic cannabinoid FDU-NNEI, two 2H-indazole isomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and NNEI indazole analog (MN-18), a phenethylamine derivative N-OH-EDMA, and a cathinone derivative