

分担研究報告書

合成カンナビノイドの中樞作用解析法に関する研究

分担研究者：船田正彦（国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 薬物依存研究部）
研究協力者：富山健一（国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

危険ドラッグとして多くの合成カンナビノイドが流通している。本研究では、合成カンナビノイドのうち carboxamide を含有する AB-FUBINACA (N-[(1S)-1-(aminocarbonyl)-2-methylpropyl]-1-[(4-fluorophenyl)methyl]-1H-indazole-3-carboxamide, AB-FUB)、5-Fluoro-AMB (methyl 2-([1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl] carbonyl)amino)-3-methylbutanoate, 5F-AMB)、5F-MDMB-PICA (methyl (2S)-2-([1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carbonyl]amino)-3,3-dimethylbutanoate, 5F-MD)、4F-MDMB-BINACA (methyl (S)-2-(1-(4-fluorobutyl)-1H-indazole-3-carboxamido)-3,3-dimethylbutanoate, 4F-ADB)について、行動薬理学的特性並びに細胞毒性の発現に関する検討を行った。1) 行動薬理学的解析：AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB による運動活性および体温に対する影響を検討した。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB により、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これら効果は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、カンナビノイド CB₁ 受容体が関与することが明らかになった。2) 精神依存性の評価：AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の精神依存形成能は、マウスを使用し conditioned place preference (CPP)法により評価した。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の条件付け（1日1回6日間）により有意な CPP の発現が確認された。この効果はカンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 前処置によって抑制された。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の条件付けによって報酬効果の発現が確認されたことから、精神依存形成能を有する危険性が示唆された。合成カンナビノイド依存形成にはカンナビノイド CB₁ 受容体が関与していると考えられる。3) CB₁ 受容体作用：CB₁ 受容体発現細胞株 CHO-CB₁ 細胞により解析した。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の添加により、細胞内 Ca²⁺が増加し、この効果は CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は CB₁ 受容体作用薬であることを確認した。4) 細胞毒性の評価：マウス limbic area の初代培養神経細胞を使用して、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB 添加による細胞生存率の評価を行った。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の添加 24 時間後の細胞生存率は有意に低下し、細胞毒性の発現が確認された。

本研究により、合成カンナビノイドのうち carboxamide を含有する AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は精神依存性を有することが明らかになった。さらに、細胞毒性を惹起することから、乱用することにより重篤な健康被害の発生が危惧される。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は、より厳格な法規制を施す必要があると考えられる。

A. 研究目的

多くの合成カンナビノイドが乱用され、重大な健康被害が発生している^{1,2)}。

本事業では、合成カンナビノイドである AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB について行動薬理学的特性並びに細胞毒性の発現に関する検討を行った。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl, 20 - 25g, 日本クレア) を使用した。

使用薬物：合成カンナビノイド AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB を使用した (Fig. 1)。

カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬として、1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-(1-piperidyl)pyrazole-3-carboxamide (AM251, Tocris Bioscience) を使用した。

1. 合成カンナビノイドの運動活性及び体温に対する影響

AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB により誘発される無動状態は、バーテストにより測定した。直腸体温は、デジタル温度計 (SANWA, TH3 型) を用いて測定した。対照群は溶媒である 0.1% DMSO 含有生理食塩液を投与した。それぞれの測定は、薬物もしくは溶媒投与の 30 分後に行った。

カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251(3mg/kg, i.p.) は、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB 投与の 15 分前に処置した。

2. 合成カンナビノイドの精神依存性評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP) 法を用いた。白黒 2 区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB を 1 日おきに投与し、30 分間装置内に閉じ込

め、6 日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である 0.1% DMSO 含有生理食塩液を投与し、薬物および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした (Table 1)。

Table 1. 薬物条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎：薬物、○：溶媒、T：テスト (薬物、溶媒ともに処置せず)

テストセッションは、7 日目に薬物および溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

3. カンナビノイド受容体作用の解析

Chinese Hamster Ovary (CHO) チャイニーズハムスター卵巣細胞にヒト CB₁ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-CB₁ 細胞を確立した。この細胞を使用して、細胞内カルシウム濃度を測定した。96穴ブラックプレート (BD Falcon, NJ, USA) に 5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C、5.0% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、薬物添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。

4. 合成カンナビノイドの細胞毒性

胎生 15 日目の新生胎児より limbic area を切り出し氷冷した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) に入れ、組織の洗浄を行った。その後、脳組織は Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotech) および gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotech) に移し、プロトコルに従って脳組織のホモジネーションを行った。組織懸濁液は、MACS Neuro Medium (with NeuroBrew-21, 2mM L-glutamine; Miltenyi Biotech) で懸濁した。細胞懸濁液を BD Falcon™ セルストレーナー (BD Falcon Biosciences) で濾過し、未消化の組織や細胞塊を除去した。得られた細胞懸濁液

は、poly-L-lysine コートした 96 well black plate (BD)に 5.0×10^4 cells/well で撒き、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\%$ CO_2 条件下で 2 日間培養した。MACS Neuro Medium (with 10 μM cytosine arabinoside, NeuroBrew-21, 2mM L-glutamine)に置換して 24 時間培養した。Cytosine arabinoside 含有 DMEM を除去し、MACS Neuro Medium にて細胞を維持し、12 日目に神経細胞毒性試験を行った。合成カンナビノイド誘導体として AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB を無血清 MACS Neuro Medium に最終濃度 30 または 50 μM となる調製し limbic culture に添加して 24 時間培養した。細胞の生存率を CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)のプロトコルに従って解析した。

C. 研究結果

1. 合成カンナビノイドの運動活性及び体温に対する影響

AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の投与により、カタレプシー様無動状態が誘発された(Fig. 2A)。同様に、直腸体温の下降が観察された(Fig. 2B)。これらの効果は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬 AM251 (3 mg/kg) の前処置により有意に抑制された。

2. 合成カンナビノイドの精神依存性評価

マウスを使用し conditioned place preference (CPP) 法による精神依存性の評価を行った。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の条件付けによって CPP の発現、すなわち報酬効果の発現が認められた(Fig. 3)。

3. カンナビノイド受容体作用の解析

CHO- CB_1 細胞を利用して、カンナビノイド CB_1 受容体に対する作用を検討した。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の添加により蛍光強度は増加した。これらの効果は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。一方、 CB_2 受容体拮抗薬 AM630 では影響が認められなかった(Fig. 4)。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD

および 4F-ADB は、 CB_1 受容体作用薬としての特性を有することが明らかになった。

4. 合成カンナビノイドの細胞毒性

AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB (30, 50 μM)処置 24 時間後、limbic culture の生存率は、それぞれ有意に低下した(Fig. 5)。

D. 考察

本研究では、合成カンナビノイド AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の行動薬理学的特性に関する解析を行った。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の投与によって、カタレプシー様無動状態および体温下降が発現した。これらの薬理作用は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬で抑制されることから、カンナビノイド CB_1 受容体を介して発現することが確認された。

マウス CPP 法により、合成カンナビノイド AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の報酬効果を解析した。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の条件付けにより、有意な報酬効果の発現が確認された。したがって、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は、精神依存形成能を有する可能性が示唆された。

CHO- CB_1 細胞を利用して、 CB_1 受容体に対する作用を検討した。AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の添加により蛍光強度は増加し、この効果は、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制されたことから、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は、 CB_1 受容体作用薬としての特性を有することが明らかになった。

最後に、合成カンナビノイドによる細胞毒性の発現について検討した。これまでに検討された合成カンナビノイド同様³⁾、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の処置によって、細胞毒性の発現が確認された。合成カンナビノイドは細胞毒性を惹起することから、乱用により、深刻な健康被害が発生する恐れ

があるものと推察された。

合成カンナビノイドは、精神依存形成能を有し、細胞毒性等の有害作用を惹起する可能性があるため、その乱用の拡大には特に注意を要すると考えられる。

E. 結論

AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB の行動薬理学特性を検討した。本事業から、AB-FUB、5F-AMB、5F-MD および 4F-ADB は精神依存性を示すことから、その乱用により重大な健康被害発生の危険性が極めて高く、麻薬として規制する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Seely KA, Lapoint J, Moran JH, Fattore L.: Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 39: 234-243, 2012.
- 2) Ford LT, Berg JD.: Analysis of legal high materials by ultra-performance liquid chromatography with time of flight mass spectrometry as part of a toxicology vigilance system: what are the most popular novel psychoactive substances in the UK? *Ann Clin Biochem*. pii: 0004563216651646, 2016.
- 3) Tomiyama K, Funada M.: Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 274(1): 17-23, 2014.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Myose T, Shirakawa A, Irie K, Yamashita Y, Nakano T, Takase Y, Matsuo K, Satho T, Tuchihashi R, Kinjo J, Tanaka H, Morimoto S,

Funada M, Sano K, Mishima K.: Δ 9-Tetrahydrocannabinol elicited 22-kHz ultrasonic vocalization changes after air puff stimulus through CB1 receptor in adult rats. *Neurosci Lett*. 701:132-135, 2019.

- 2) 船田正彦: 米国の大麻規制と薬物乱用防止. *日本薬剤師会雑誌*. 71(2), 75, 2019.
- 3) 船田正彦, 三島健一: 薬物乱用のトレンド: ポスト危険ドラッグとして的大麻問題を考える. *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2), 171-172, 2020.
- 4) 富山健一, 船田正彦: 米国における大麻規制の現状: 医療用途と嗜好品. *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2), 179-192, 2020.
- 5) 船田正彦, 富山健一: 大麻成分の依存性と細胞毒性. *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2), 205-214, 2020.
- 6) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00527-w>

2. 学会発表

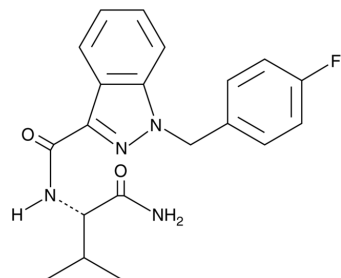
- 1) Funada, M., Tomiyama, K.: Effects of cannabinoids on neuronal activity in mouse cerebellar cultures assessed using multi-electrode array techniques. College on problems of drug dependence (CPDD) 81th Annual scientific meeting, San Antonio, TX, USA., 2019.6.11-16.
- 2) Funada, M.: The harmful effects of new psychoactive substances (NPS): assessment of drug abuse liability and cytotoxicity. International Conference on New Psychoactive Substances, Taipei, TAIWAN. 2019.7.11-15.
- 3) 山田理沙, 嶋根卓也, 船田正彦: レクリエーショナル・セッティングにおける危険ドラッグ使用の実態調査. 2019年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 北海道, 2019年10月5日.
- 4) 船田正彦, 富山健一: 大麻成分の有害作用に関する研究: 依存性と細胞毒性. 第49回日本神経精神薬理学会, 福岡, 2019年10月12-13日.
- 5) 富山健一, 船田正彦: 国内外における大麻規制の現状: 医療応用と嗜好品. 第49回

日本神経精神薬理学会，福岡，2019年10月12-13日

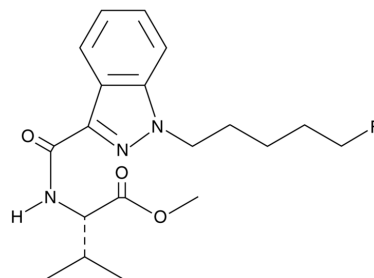
- 6) 船田正彦：薬物乱用に関する最新海外事情：大麻と危険ドラッグをめぐる諸問題．日本旅行医学会 2019年 第12回 東京大会，東京，2019年11月7日．
- 7) 船田正彦，富山健一：薬物乱用の変遷：危険ドラッグから大麻へ．第29回神経行動薬理若手研究者の集い，横浜，2020年3月15日．
- 8) 富山健一，船田正彦：大麻および関連化合物の依存性と細胞毒性．第29回神経行動薬理若手研究者の集い，横浜，2020年3月15日．

H. 知的財産権の出願・登録状況

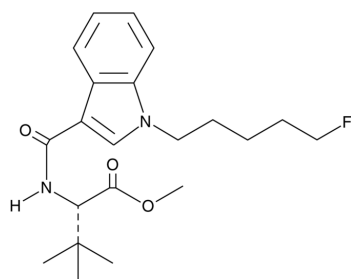
特許取得、実用新案登録、その他
特になし



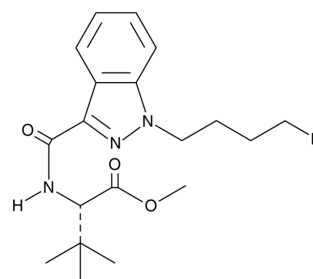
AB-FUBINACA



5F-AMB



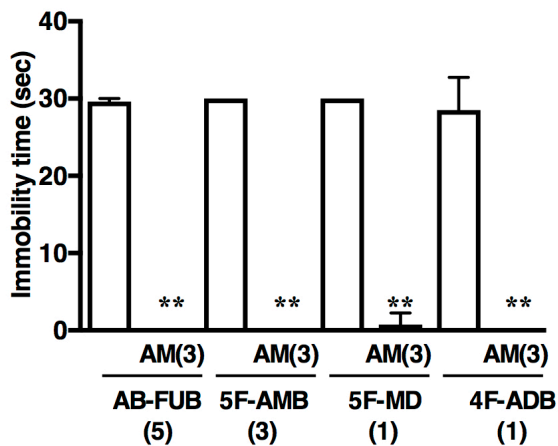
5F-MDMB-PICA



4F-MDMB-BINACA

Fig. 1. Chemical structures of AB-FUBINACA, 5F-AMB, 5F-MDMB-PICA or 4F-MDMB-BINACA

(A) 無動



(B) 体温

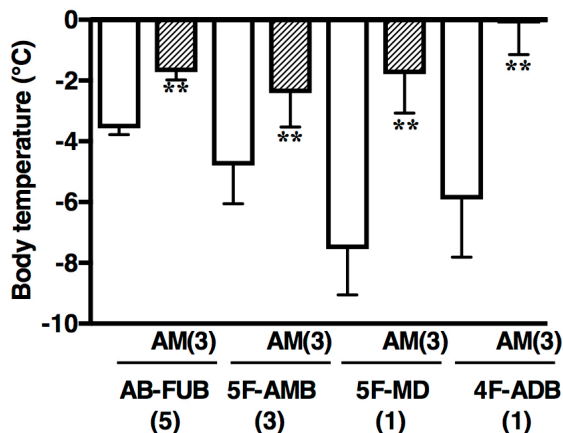


Fig. 2.

Effect of synthetic cannabinoid on general behavior and rectal temperature in mice. (A) The incidence of immobility with the forelimbs placed on a standard horizontal bar (4 cm high). (B) Effect of and AB-FUBINACA (AB-FUB, 5 mg/kg), 5Fluoro-AMB (5F-AMB, 3 mg/kg), 5F-MDMB-PICA (5F-MD, 1 mg/kg) and 4F-MDMB-BINACA (4F-ADB, 1 mg/kg) on the body temperature in mice. For antagonist study, AM251 (AM, 3 mg/kg) was administered 15 min before treatment of AB-FUB (5 mg/kg), 5F-AMB (3 mg/kg), 5F-MD (1 mg/kg) or 4F-ADB (1 mg/kg). Each column represents the mean with S.E.M. of 8 animals in AB-FUB-treated groups and AM-pretreated groups, 5F-AMB-treated groups and AM-pretreated groups, 5F-MD-treated groups and AM-pretreated groups, 4F-ADB-treated groups and AM-pretreated groups. ** $P < 0.01$ vs. AB-FUB, 5F-AMB, 5F-MD or 4F-ADB-treated group.

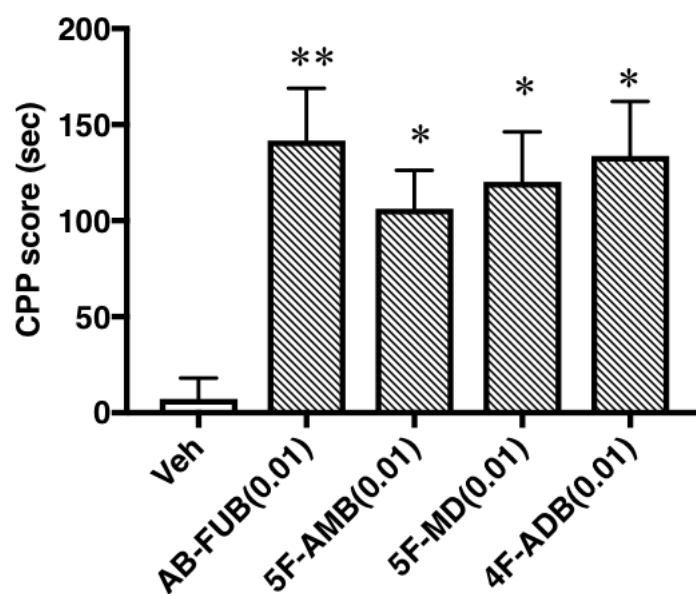


Fig. 3.

Effect of synthetic cannabinoid on place conditioning in mice. Place conditioning produced by AB-FUBINACA (AB-FUB, 0.01 mg/kg), 5Fluoro-AMB (5F-AMB, 0.01 mg/kg), 5F-MDMB-PICA (5F-MD, 0.01 mg/kg) and 4F-MDMB-BINACA (4F-ADB, 0.01 mg/kg). Conditioning sessions (3 for drug; 3 for vehicle: Veh) were conducted. On day 7, test of conditioning was performed. Conditioning scores (CPP score) represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the vehicle-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 10-12 animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Veh-treated group.

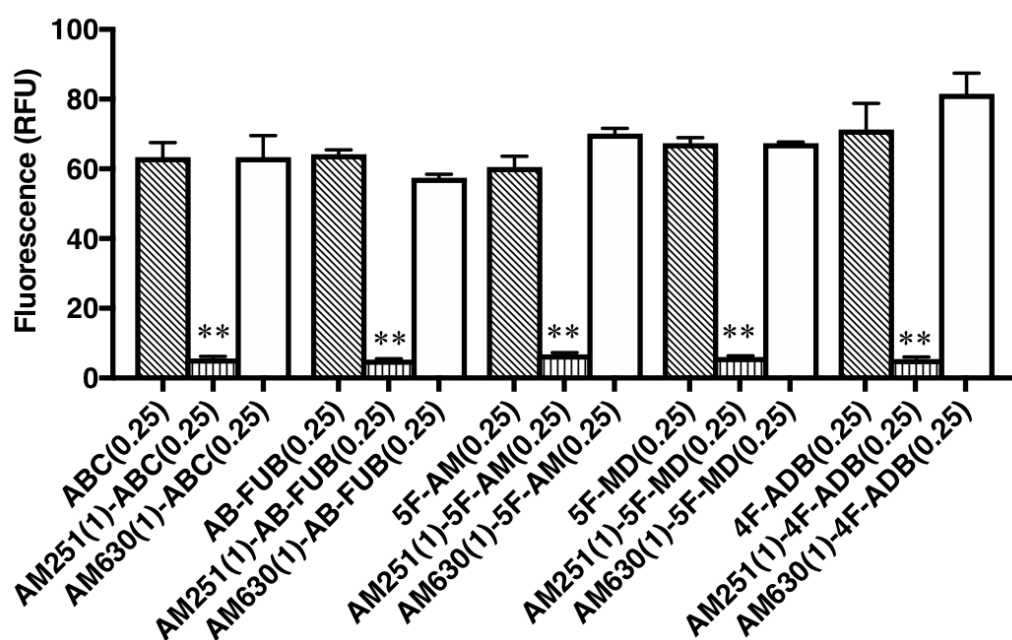


Fig. 4.

Effects of synthetic cannabinoids on intracellular Ca^{2+} in CHO- CB_1 cells. For antagonist study, AM251 (CB_1 antagonist, $1 \mu\text{M}$) or AM630 (CB_2 antagonist, $1 \mu\text{M}$) was administered 15 min before administration of synthetic cannabinoids, AB-FUB ($0.25 \mu\text{M}$), 5F-AMB ($0.25 \mu\text{M}$), 5F-MD ($0.25 \mu\text{M}$) or 4F-ADB ($0.25 \mu\text{M}$). Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. synthetic cannabinoid-treated group.

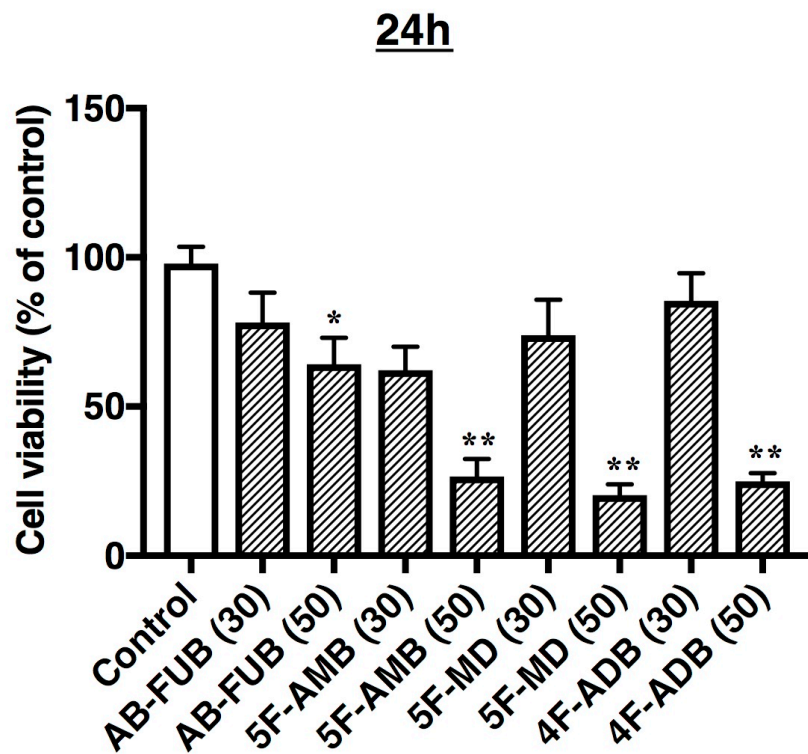


Fig. 5.

Cell viability in limbic cultures after treatment with synthetic cannabinoids. The relative value of cell viability compared to the baseline value for control (0.05% DMSO) and limbic cultures treated with AB-FUB (30, 50 μ M), 5F-AMB (30, 50 μ M), 5F-MD (30, 50 μ M) and 4F-ADB (30, 50 μ M) for 24 h. Mean percent changes \pm S.E.M. are shown. Statistical significance was evaluated with one-way analysis of variance. The Dunnett's multiple comparison test was used to determine significant differences in the percentage of cells showing cell viability (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) from that observed in controls at the 24 h time point.

分担研究報告書

コンピュータシミュレーションによる有害性予測法の開発

分担研究者：栗原正明（国際医療福祉大学 薬学部）

【研究要旨】

危険ドラッグ及び関連化合物を速やかに規制するためには、それらの迅速な評価法が必要である。それには、インシリコ活性予測法が有効である。本研究では、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を用いて危険ドラッグの活性予測を行い、危険ドラッグの規制、特に包括指定の範囲を決める等のデータを供するための新規評価法の開発を行うことを目的とする。本年度はドッキングスタディを行いドッキングスタディの評価関数と実際の活性値との相関を調べた。

A. 研究目的

違法ドラッグが大きな社会問題となっている。そこで、違法ドラッグを速やかに規制するためには、違法ドラッグの迅速な評価法が必要である。それには、インシリコ活性予測法が有効である。本研究では、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を用いて危険ドラッグの活性予測を行い、危険ドラッグの規制、特に包括指定の範囲を決めるデータを供することを目的とする。昨年度はフェンタニル類縁体の QSAR モデルの構築を行った(Fig. 1)。活性値が既知である 9 種の化合物を用いて行った。非常に相関性の高い QSAR モデルが得られた。本年度はドッキングスタディを行いドッキングスタディの評価関数と実際の活性値との相関を調べた。

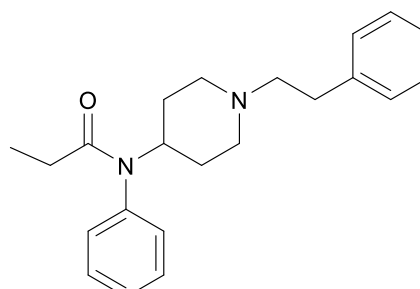


Fig. 1. Fentanyl

B. 研究方法

- MOEを用いてドッキングスタディを行った。
- リガンドとして、活性既知のフェンタニル類縁化合物 8 種類を用いた (Table 1)。
- 標的タンパク質オピオイド μ 受容体として、PDB の 6DDE を使用した (Fig. 2a, b)。
- 今回、スコアリング関数は affinity、Alpha HB、GB/VI、None、London dG の 5 種類を使用した。

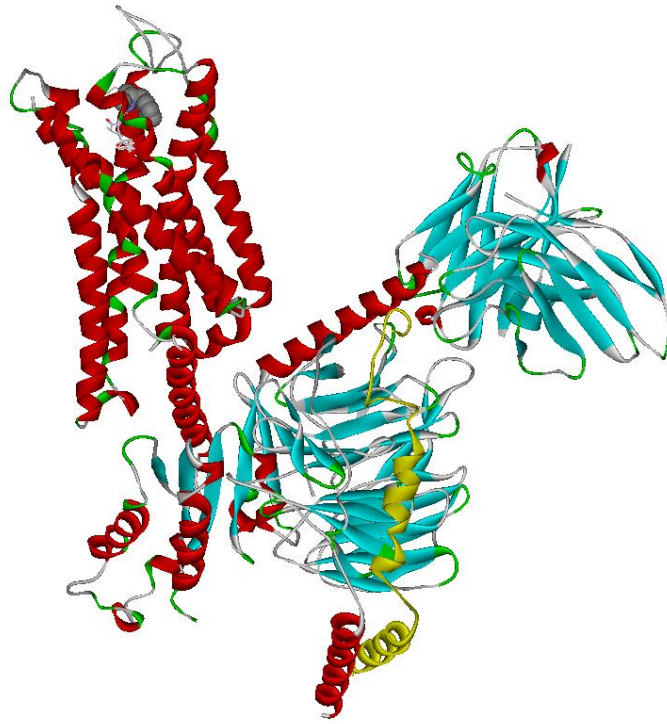


Fig. 2a オピオイド μ 受容体 (6DDE)

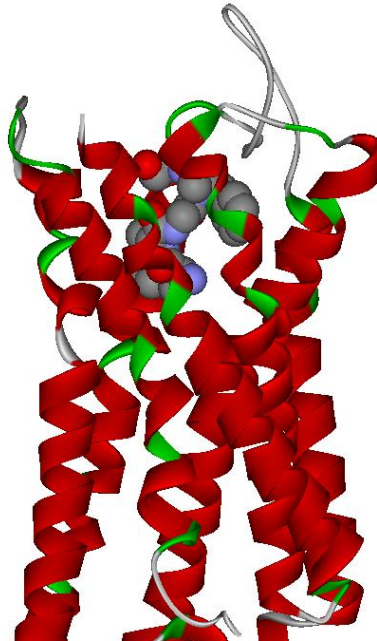


Fig. 2b オピオイド μ 受容体 (6DDE)

C. 研究結果

- MOE を用いてドッキングスタディを行い評価関数-S を算出した。-S と活性値をプロットした。(Fig. 3)
- 得られた S 値をリガンドの重原子数で除し、スコアの補正を行った。
- GB/VI を使用した場合、最も活性値との相関が高くなった。

D. 考 察

フェンタニル類縁体のドッキングスタディを行いドッキングスタディの評価関数と実際の活性値との相関を調べた。ドッキングスタディの評価関数と実際の活性値にはある程度の相関を示すことが明らかとなった。今後、フェンタニル類の包括規制への展開が期待される。

E. 結 論

本年度は、ドッキングスタディを行いドッキングスタディの評価関数と実際の活性値との相関を調べた。フェンタニル類の包括規制への展開が期待できる。

F. 参考文献

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohoka N, Tsuji G, Shoda T, Fujisato T, Kurihara M, Demizu Y, Naito M. Development of Small Molecule Chimeras That Recruit AhR E3 Ligase to Target Proteins. *ACS Chem Biol.*, 2019, 14, 2822-2832

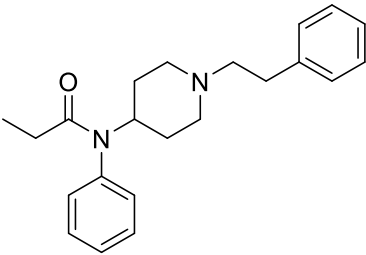
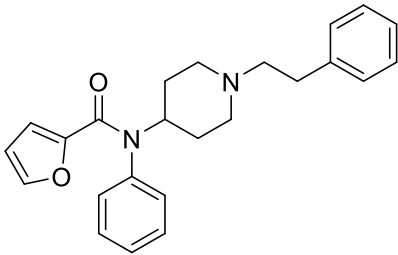
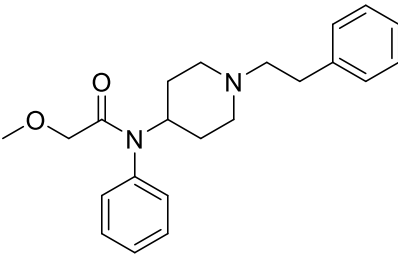
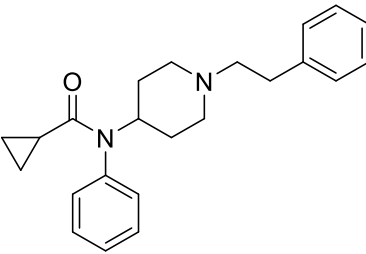
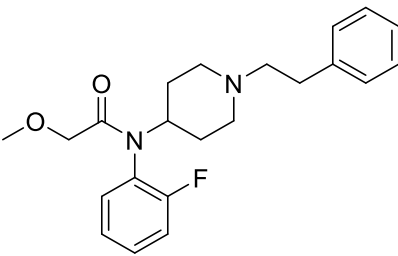
2. 学会発表

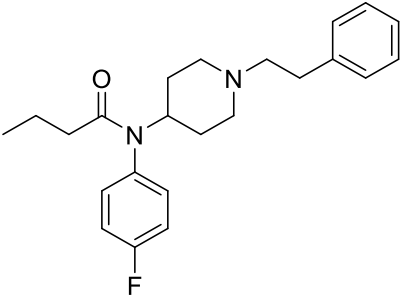
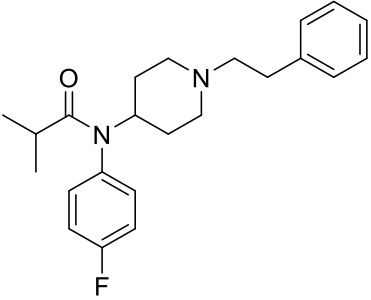
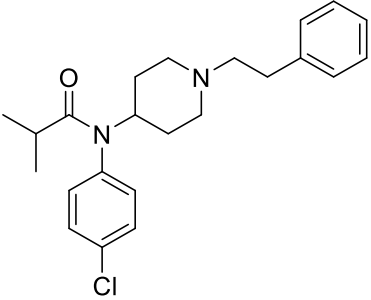
- 1) 湯山円晴, 門脇有希, 荒井裕美子, 阿久津友規, 玉澤宏仁, 金谷貴行, 船田正彦, 栗原正明
QSAR 及びドッキングスタディによるオピオイド μ 受容体リガンドの活性評価
日本薬学会第 140 年会 (2020/03/26-28, 京都)
- 2) 門脇有希, 湯山円晴, 荒井裕美子, 阿久津友規, 玉澤宏仁, 飯山夏海, 慶野綾子, 平岡優里奈, 伊藤 岳, 金谷貴行, 百瀬泰行, 栗原正明
定量的構造活性相関 (QSAR) を用いた抗コリン作用のリスク予測法の構築
日本薬学会第 140 年会 (2020/03/26-28, 京都)

I. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他特になし。

Table 1

	化合物名	構造	EC ₅₀
1	Fentanyl		2.88×10^{-8}
2	N-phenyl-N-(1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl)furan-2-carboxamide		6.45×10^{-10}
3	2-methoxy-N-(1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl)-N-phenylacetamide		1.81×10^{-8}
4	N-(1-phenethylpiperizin-4-yl)-N-phenylcyclopropanecarboxamide		1.23×10^{-9}
5	N-(2-Fluorophenyl)2-methoxy-N-(1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl)acetamide		1.77×10^{-9}

6	N-(4-fluorophenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)butyramide		6.43 x 10 ⁻⁹
7	N-(4-fluorophenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)isobutyramide		6.43 x 10 ⁻⁹
8	N-(4-chlorophenyl)-N-(1-phenethylpiperidin-4-yl)isobutyramide		4.63 x 10 ⁻⁸

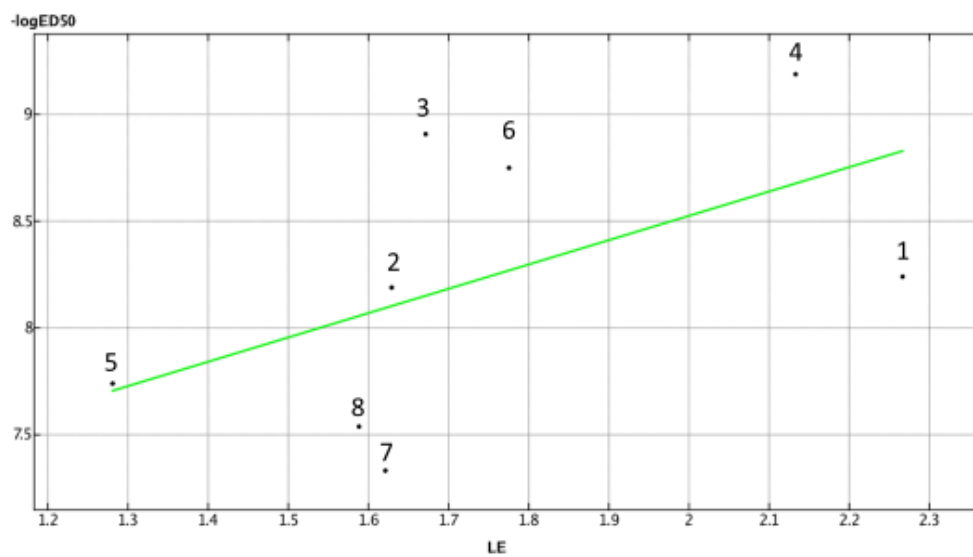


Fig. 2 フェンタニル類縁化合物ドッキング結果： 縦軸：実測値、横軸：LE (-S/重原子数)

分担研究報告書

危険ドラッグおよび類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発
～神経炎症関連分子 HMGB1 を指標にして 2～

分担研究者：浅沼幹人（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座脳神経機構学 教授）
研究協力者：宮崎育子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座脳神経機構学 助教）

【研究要旨】

[緒言] 危険ドラッグおよび覚せい剤など乱用薬物による神経障害において神経炎症は重要な役割を果たすと考えられる。核内 DNA 結合タンパク質 High mobility group box-1 (HMGB1)は、組織損傷時に細胞外へ放出され、RAGE、Toll-like receptor に結合し炎症惹起に働く damage-associated molecular patterns (DAMPs)として知られている。本研究では、神経細胞毒性発現の共通の作用点となりうる神経炎症関連標的分子と想定される起炎物質 DAMPs の代表である HMGB1 に着目し、モノアミン系培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ(METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C, PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine)添加による HMGB1 の発現動態の変化について検討し、その有害性指標としての可能性について評価した。

[結果] モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞株 B65 細胞への 3 時間曝露により、2C-C, 2CT-4 > harmaline, harmine > 2CT-7 (形態的变化：100 μ M \sim) > MDMA (500 μ M \sim) > PP, METH, PMMA, methylone, 4FMP (1 mM \sim) > 5MeO-MIPT, 5MeO-DMT (2 mM \sim)の順で、著明な細胞死が観察された。培養 B65 細胞への 3 時間曝露により、4FMP, 2CT-7, 5MeO-DMT を除く薬剤では、HMGB1 の核外移行、細胞外放出を示す核内 HMGB1 シグナル強度の有意な減少が認められた。その作用の強さは 2CT-4, 2C-C (50 μ M \sim) > harmaline (50 μ M \sim) > harmine (100 μ M \sim) > PP (500 μ M \sim) > METH (500 μ M \sim), PMMA (1 mM \sim) > MDMA, methylone (1 mM \sim) > 5MeO-MIPT (1 mM)の順であった。

[考察] 各種乱用薬物、危険ドラッグのモノアミン系培養神経細胞への曝露早期における HMGB1 の核外移行への作用と神経細胞障害性は、2CT-7 を除いて相関しており、昨年度の METH 投与マウスの線条体神経細胞での HMGB1 核外移行と抗 HMGB1 抗体投与による神経終末脱落抑制効果を考えあわせると、HMGB1 の発現および核外移行は神経障害、特に神経炎症の鋭敏な指標となりうると思われる。神経炎症を問わず HMGB1 の核外移行、酸化ストレスを問わず活性酸素種生成など複数の早期神経障害指標を用いて評価することが望ましいと考えられた。

A. 研究目的

これまでに、培養神経細胞を用いて、危険（違法、脱法）ドラッグの神経細胞毒性に関する検討を行い、毒性発現のプロファイルならびに構造毒性相関を明らかにしてきた¹⁾¹²⁾。

これらの知見は、一定の構造を有する薬剤を指定薬物にすることで包括的に規制することの必要性、重要性を示すものである。しかし、次々に別の類似構造をもつ化学物質が製造され、流通・乱用されていることから、危険ドラッグおよび類似化学物質の危険性および精

神・神経毒性を予測する技術、すなわち精神・神経毒性発現の蓋然性の指標となる生体分子への作用を簡便に迅速に評価できるスクリーニング法の確立が急務であると考えられた。

平成 20 年度から平成 26 年度の各種危険ドラッグのモノアミン系神経細胞への障害性の検討において、蛍光指示薬によるミトコンドリアでの活性酸素種生成の検出法は、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の危険ドラッグ暴露早期において細胞内での活性酸素種生成を検出できることから、迅速かつ感度良く、しかも軽微な細胞障害性を評価できる方法として、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であることを明らかにした⁶⁻¹²⁾。

平成 27 年度から平成 29 年度の一連の検討で、危険ドラッグの精神・神経毒性発現の蓋然性を示す共通の作用点となりうると考えられるモノアミン酸化酵素 MAO 阻害活性に着目し、発光性 MAO 基質による MAO 活性の発光検出システムを用いれば、精製された粉末・顆粒状乱用ドラッグの水溶液の MAO 阻害活性を非常に高感度で簡便に評価でき、精神・神経毒性発現の蓋然性をスクリーニングする有用な方策の一つとなりうることを明らかにできた¹³⁻¹⁵⁾。

危険ドラッグおよび覚せい剤など乱用薬物による神経障害において神経炎症は重要な役割を果たすと考えられる。High mobility group box-1 (HMGB1)は、核内 DNA 結合タンパク質であるが、組織損傷に応じて細胞外へ放出され、Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE)、Toll-like receptor に結合し炎症惹起に働く damage-associated molecular patterns (DAMPs)として知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。

これまでの研究により、脳卒中(脳梗塞、脳出血)、脳外傷、てんかん、神経因性疼痛モデルにおいて HMGB1 発現が誘導されており、中和活性を有する抗 HMGB1 抗体を投与することによって神経障害が有意に抑制されることが報告されている¹⁹⁾。本研究では、神経細胞毒性発現の共通の作用点となりうる神経炎症関連標的分子と想定される起炎物質 DAMPs

の代表である HMGB1 に着目し、昨年度平成 30 年度は覚せい剤メタンフェタミン(METH)急性投与神経毒性モデルマウスにおける HMGB1 の発現動態ならびにモノアミン神経毒性に対する抗 HMGB1 抗体の効果について検討した。METH 投与により、惹起されるドーパミン(DA)系神経障害に関連する高体温、DA トランスポーター(DAT)の減少、DA 神経終末の脱落とともに、起炎物質 HMGB1 の末梢血中での増加ならびに線条体神経細胞での HMGB1 の核から細胞質への移行・放出がみられること、さらに抗 HMGB1 抗体の静脈内投与によりこれら METH 投与による HMGB1 血中濃度の上昇と神経細胞での核外移行、高体温、DAT の減少、DA 神経終末の脱落が有意に抑制できることを明らかにし、HMGB1 が乱用薬物により惹起される神経細胞毒性発現の共通分子となりうる可能性を示した²⁰⁾。今年度は、モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ添加による HMGB1 の発現動態の変化について検討し、その有害性指標としての可能性について評価した。

B. 研究方法

1. モノアミン系培養神経細胞への危険(違法)ドラッグ暴露

ラットモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞を継代して 4-チャンバースライドに播種して (3×10^4 cells/cm²)、48 時間後に、13 種の乱用薬物あるいは危険ドラッグである METH (最終濃度 500 μ M-2 mM)、MDMA (250 μ M-1 mM)、methyline (500 μ M-2 mM)、4-fluoroamphetamine (4FMP: 500 μ M-2 mM)、4-methoxymethamphetamine (PMMA: 500 μ M-2 mM)、2,5-dimethoxy-4-propylthiophenethylamine (2CT-7: 50 -250 μ M)、2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4: 50 -250 μ M)、2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C: 50 -250 μ M)、phenylpiperazine (PP: 500 μ M-2 mM)、5-

methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT: 500 μ M-2 mM), N-isopropyl-5-methoxy-N-methyltryptamine (5MeO-MIPT: 500 μ M-2 mM), harmaline (50 -250 μ M)および harmine (50 -250 μ M)を添加し、3時間培養し、4% paraformaldehyde による固定を行った。

2. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による HMGB1 発現変化の評価

乱用薬物あるいは危険ドラッグ METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C, PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine (最終濃度 50 μ M-2 mM) を 3時間曝露した B65 細胞における HMGB1 発現を抗 HMGB1 抗体を用いた蛍光免疫組織化学法で評価した。

細胞膜浸透処理のため 0.1% Triton X-100 加 PBS (PBS-T)を用い、抗体に対しての非特異的の反応を防ぐために、1%正常ヤギ血清で 20 分間ブロッキング処理を行った。PBS-T で希釈した 1 次抗体、ウサギ抗 HMGB1 ポリクローナル抗体(abcam: ab18256, 500 倍希釈)と 4°C で 1 晩反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、500 倍希釈した二次抗体、ヤギ抗ウサギ IgG Alexa Fluor488 抗体(Alexa: A-11034)と室温で 1.5 時間 incubate した。PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行い、Hoechst33342 (Thermo Fisher)による核染色を行った。PBS での洗浄後、スライドガラスを DAKO Fluorescence Mounting Medium を用いて封入した。

HMGB1 陽性シグナルの蛍光強度を cellSens ソフトウェア(Olympas)によって測定した。有意差検定は、one-way ANOVA および *post-hoc* test として Fisher LSD 法を用いた。

C. 研究結果

1. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による曝露早期における HMGB1 発現変化

今回の検討で用いた乱用薬物あるいは危険

ドラッグのモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞への 3 時間曝露により、2C-C (形態的变化 : 100 μ M \sim), 2CT-4 (100 μ M \sim) > harmaline (100 μ M \sim), harmine (100 μ M \sim) > 2CT-7 (100 μ M \sim) > MDMA (500 μ M \sim) > PP (1 mM \sim), METH (1 mM \sim), PMMA (1 mM \sim), methylone (1 mM \sim), 4FMP (1 mM \sim) > 5MeO-MIPT (2 mM), 5MeO-DMT (2 mM \sim)の順で、著明な細胞数の減少(細胞死)が観察された (Figs. 1 \sim 13)。

2. モノアミン系培養神経細胞への乱用薬物、危険ドラッグ暴露による曝露早期における HMGB1 発現変化

各種乱用薬物あるいは危険ドラッグの培養 B65 細胞への 3 時間曝露により、4FMP, 2CT-7, 5MeO-DMT を除く薬剤では、核内の HMGB1 シグナル強度の有意な減少が認められた

(Figs. 1 \sim 13)。2CT-4 (50, 100, 250 μ M), 2C-C (50, 100, 250 μ M) > harmaline (50, 100, 250 μ M) > harmine (100, 250 μ M) > PP (500 μ M, 1, 2 mM) > METH (500 μ M, 1, 2 mM), PMMA (1, 2 mM) > MDMA (1 mM), methylone (1, 2 mM) > 5MeO-MIPT (1, 2 mM)の順で強い核内 HMGB1 シグナルの減少効果が認められた。また、その効果は harmaline, harmine 以外では濃度依存性であった。4FMP, 5MeO-DMT (500 μ M-2 mM)については、核内 HMGB1 シグナルの濃度依存的な減少傾向は認められたが、有意ではなかった。2CT-7 については 250 μ M においてのみ減少傾向が認められたが有意ではなかった。

D. 考察

昨年度は、マウスへの METH 投与により惹起されるモノアミン系神経障害に関連する高体温、DAT の減少、DA 神経終末の脱落とともに、起炎物質 DAMPs のひとつの HMGB1 の末梢血中での増加ならびに線条体神経細胞での HMGB1 の核から細胞質への移行・放出がみられることを明らかにした²⁰⁾。さらに、

抗 HMGB1 抗体の静脈内投与により、これら METH 投与による HMGB1 血中濃度の上昇と神経細胞での核外移行、高体温、DAT の減少、DA 神経終末の脱落を有意に抑制することができた²⁰⁾。これらの結果は、HMGB1 が METH 急性神経毒性に関与していることを明らかにしたとともに、HMGB1 が METH 急性神経毒性緩和の標的となりうることを示した。

今年度は、培養細胞系での HMGB1 の発現動態の評価が危険ドラッグ等の有害性のスクリーニング指標になる可能性を探るべく、モノアミン系セロトニン含有培養神経細胞系を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ添加による細胞障害ならびに HMGB1 の発現動態の変化について検討した。

各種乱用薬剤、危険ドラッグの培養モノアミン系セロトニン含有神経細胞への曝露 3 時間後という比較的早期においても、細胞数の減少（細胞死）は観察され、形態的变化の出現濃度については、2C-C (100 μ M \sim), 2CT-4 (100 μ M \sim) > harmaline (100 μ M \sim), harmine (100 μ M \sim) > 2CT-7 (100 μ M \sim) > MDMA (500 μ M \sim) > PP (1 mM \sim), METH (1 mM \sim), PMMA (1 mM \sim), methylone (1 mM \sim), 4FMP (1 mM \sim) > 5MeO-MIPT (2 mM), 5MeO-DMT (2 mM \sim) の順であった。「2C シリーズ」や植物由来ハルマラの催幻覚成分では、METH や MDMA よりもはるかに強い神経細胞障害が早期から惹起されることがわかった。

HMGB1 の蛍光免疫染色と Hoechst33342 核染色により、乱用薬剤、危険ドラッグの曝露 3 時間後の早期から、2CT-7 を除く多くの薬剤で起炎物質 HMGB1 の核外移行・細胞外放出を示す核内 HMGB1 シグナル強度の減少が認められ、その作用の強さは 2CT-4 (50 μ M \sim), 2C-C (50 μ M \sim) > harmaline (50 μ M \sim) > harmine (100 μ M \sim) > PP (500 μ M \sim) > METH (500 μ M \sim), PMMA (1 mM \sim) > MDMA (1 mM), methylone (1 mM \sim) > 5MeO-MIPT (1 mM) >> 4FMP, 5MeO-DMT > 2CT-7 の順であった。2CT-7 を除いて HMGB1 の核外移行への作用と神経細胞障害性（細胞死）は相関し

ていた。昨年 of *in vivo* の METH 投与マウスでの検討²⁰⁾において、末梢血中での HMGB1 の増加、神経細胞での HMGB1 核外移行、DA 神経終末の脱落が抗 HMGB1 抗体投与により抑制されたことを考えあわせると、HMGB1 の発現および核外移行は神経障害、特に神経炎症の鋭敏な指標となりうると考えられた。

我々はこれまでに本検討と同じ培養モノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞への各種危険ドラッグの障害性の検討を行い（平成 20 \sim 26 年度）、蛍光指示薬 MitoTracker CM-H₂XRos によるミトコンドリアでの活性酸素種生成の検出法は、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の危険ドラッグ暴露早期（曝露 3 時間後）において神経細胞内での活性酸素種生成を検出できることを示し、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であることを明らかにした^{6,12,21)}。本検討で用いた乱用薬物の 3 時間曝露で活性酸素種生成をもたらす濃度は、2CT-7 50 μ M \sim , PP 250 μ M \sim であったが、2C-C, 2CT-4 では有意な活性酸素種生成はみられなかった^{6,7,9,21)}。

今回用いた「2C シリーズ」について、2CT-7, 2CT-4, 2C-C はいずれも METH, MDMA に比して著明なモノアミン系神経細胞死をもたらすが、HMGB1 の核外移行は 2CT-4, 2C-C で著明であるが、2CT-7 では有意な変化はなく、活性酸素種生成については逆に 2CT-7 で著明であるが、2CT-4, 2C-C では有意な変化は認められなかった。したがって、乱用薬物、危険ドラッグの有害性のスクリーニングでは、培養神経細胞系における神経炎症をあらわす HMGB1 の核外移行、酸化ストレスをあらわす活性酸素種生成など複数の早期神経障害指標を用いて評価することが望ましいと考えられた。

E. 結 論

モノアミン系培養神経細胞系を用いて 13 種の乱用薬物、危険ドラッグ(METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, 2CT-7, 2CT-4, 2C-C,

PP, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, harmaline, harmine)添加による起炎物質 HMGB1 の発現動態の変化について検討し、曝露 3 時間後の早期から 2CT-7 を除く多くの薬剤で HMGB1 の核外移行・細胞外放出を示す核内 HMGB1 シグナル強度の減少が認められ、神経細胞障害性と相関することを明らかにできた。HMGB1 の発現および核外移行は神経障害、特に神経炎症の鋭敏な指標となりうると考えられた。

F. 参考文献

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P15-24, 2004.
- 2) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-42, 2005.
- 3) 浅沼幹人, 宮崎育子: 脱法ドラッグ (違法ドラッグ) の構造修飾に基づく神経毒性発現の研究. 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)「脱法ドラッグの構造修飾特性とその依存性および神経毒性発現の関連性」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P22-33, 2006.
- 4) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P30-65, 2007.
- 5) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P36-64, 2008.
- 6) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグの構造修飾と神経毒性発現の相関に関する研究. 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの薬物依存形成メカニズムとその乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P81-108, 2009.
- 7) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグによる神経・細胞毒性の発現機序に関する多角的検討. 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P38-55, 2010.
- 8) 浅沼幹人, 宮崎育子: フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P42-57, 2011.
- 9) 浅沼幹人, 宮崎育子: 違法ドラッグの早期神経細胞毒性の簡易迅速評価. 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発現機序と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P37-49, 2012.

- 10) 浅沼幹人, 宮崎育子:培養細胞を用いた違法ドラッグの神経細胞毒性評価と構造相関. 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P49-68, 2013.
- 11) 浅沼幹人, 宮崎育子:培養細胞を用いたカチノン系違法ドラッグの神経細胞毒性評価. 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). 2014.
- 12) 浅沼幹人, 宮崎育子: 合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価. 平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). 2015.
- 13) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～. 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). 2016.
- 14) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～2. 平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). 2017.
- 15) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび類似化学物質の精神・神経毒性発現の蓋然性に関する簡易迅速スクリーニング法の開発～モノアミン酸化酵素阻害活性を指標にして～3. 平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグおよび関連代謝産物の有害性予測法の確立と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). 2018.
- 16) Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A., Tracey, K.J.: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285 (5425): 248-251, 1999.
- 17) Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H.E., Susarla, S.M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C.J., Wang, H., Roth, J., Warren, H.S., Fink, M.P., Fenton, M.J., Andersson, U., Tracey, K.J.: Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (1): 296-301, 2004.
- 18) Andersson, U., Tracey, K.J.: HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu. Rev. Immunol.*, 29: 139-162, 2011.
- 19) 西堀正洋: DAMP としての HMGB1 と抗 HMGB1 抗体療法. *日本薬理学雑誌*, 151 (1): 4-8, 2018.
- 20) 浅沼幹人, 宮崎育子:危険ドラッグおよび

類似物質の有害性簡易スクリーニング法の開発～神経炎症関連分子 HMGB1 を指標にして～. 平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)「危険ドラッグ及び関連代謝物の有害作用解析と乱用実態把握に関する研究」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). 2019.

- 21) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, in press.

Yamamoto, D., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Dopaminergic neuroprotective effects of rotigotine via 5-HT1A receptors: possibly involvement of metallothionein expression in astrocytes. *Neurochem. Int.*, 132: 104608, 2020. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104608

- 5) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, in press.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asanuma, M., Okumura-Torigoe, N., Miyazaki, I., Murakami, S., Kitamura, Y., Sendo, T.: Region-specific neuroprotective features of astrocytes against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(3): 598, 2019. doi:10.3390/ijms20030598
- 2) Miyazaki, I., Iooka, N., Wada, K., Kikuoka, R., Kitamura, Y., and Asanuma, M.: Effects of enteric environmental modification by coffee components on neurodegeneration in rotenone-treated mice. *Cells*, 8(3): 221, 2019. doi:10.3390/cells8030221
- 3) Nakahara, K., Fujikawa, K., Hiraoka, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ito, A., Takasugi, N. and Uehara, T.: Attenuation of macrophage migration inhibitory factor-stimulated signaling via S-nitrosylation. *Biol. Pharm. Bull.*, 42(6): 1044-1047, 2019. doi: 10.1248/bpb.b19-00025
- 4) Iooka, N., Miyazaki, I., Kikuoka, R., Wada, K., Nakayama, E., Shin, K.,

2. 学会発表

- 1) Miyazaki, I., Iooka, N., Wada, K., Kikuoka, R., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Treatment with coffee ingredients protects central and myenteric neurons in parkinsonian model. 第 92 回日本薬理学会年会, 大阪, 2019.3.14-16.
- 2) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 禪正和真, 新居 麗, 園部奏生, 船越英丸, 中山恵利香, 進 浩太郎, 山本大地, Kyle Quin, 浅沼幹人: 妊娠・授乳期にエポキシ樹脂曝露した新生仔マウスの脳発達に関する組織学的・行動学的解析. 第 124 回日本解剖学会総会, 新潟, 2019.3.27-29.
- 3) Miyazaki, I., Iooka, N., Kikuoka, R., Wada, K., Nakayama, E., Shin, K., Yamamoto, D., Kitamura, Y., Asanuma, M.: Rotigotine protects dopaminergic neurons via astrocytic serotonin 1A receptors. 第 60 回日本神経学会学術大会, 大阪, 2019.5.22-25.
- 4) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 禪正和真, 新居 麗, 園部奏生, 船越英丸, 中山恵利香, 進 浩太郎, 山本大地, Kyle Quin, 浅沼幹人: 妊娠・授乳期のエポキシ樹脂曝露が新生仔マウスに及ぼす行動毒性.

- 第 46 回日本毒性学会学術年会, 徳島, 2019.6.26-28.
- 5) Asanuma, M., Okumura-Torigoe, N., Miyazaki, I., Murakami, S., Kitamura, Y. and Sendo, T.: Region-specific features of astrocytes against dopaminergic neurotoxin-induced oxidative stress. 14th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Porto, 2019.7.10-13.
- 6) Miyazaki, I., Asanuma, M., Murakami, S., Kikuoka, R., Iooka, N., Sogawa, C., Sogawa, N. and Kitamura, Y.: Regional differences in reaction of astrocytes against rotenone contribute to dopaminergic neurodegeneration. 14th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Porto, 2019.7.10-13.
- 7) 浅沼幹人, 奥村(鳥越) 菜央, 宮崎育子, 村上真樹, 北村佳久, 千堂年昭: ドパミン神経毒による酸化ストレスに対するアストロサイトの分子発現および神経保護作用の部位特異性. 第 13 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 東京, 2019.7.25-27.
- 8) 宮崎育子, 浅沼幹人, 村上真樹, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久: 部位特異的アストロサイト機能不全がもたらすロテノン誘発ドパミン神経障害. 第 13 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 東京, 2019.7.25-27.
- 9) 菊岡 亮, 宮崎育子, 村上真樹, 北村佳久, 千堂年昭, 浅沼幹人: 抗うつ薬ミルタザピンの神経-グリア連関を介したドパミン神経保護作用. 第 31 回創薬・薬理フォーラム, 岡山, 2019.7.27.
- 10) Miyazaki, I., Asanuma, M., Murakami, S., Kikuoka, R., Iooka, N., Sogawa, C., Sogawa, N. and Kitamura, Y.: Involvement of region-specific glial dysfunction in rotenone neurotoxicity. VI AsCNP2019, Fukuoka, 2019.10.11-13.
- 11) 菊岡 亮, 野村昌紀, 磯岡奈未, 宮崎育子, 十川紀夫, 十川千春, 北村佳久, 浅沼幹人: 高齢メタロチオネインノックアウトマウスにおける脳組織学的変化. メタルバイオサイエンス研究会 2019, 東京, 2019.10.29.
- 12) 磯岡奈未, 宮崎育子, 和田晃一, 菊岡 亮, 古川智英子, 北村佳久, 浅沼幹人: ロテノン投与パーキンソン病モデルにおけるコーヒー成分のメタロチオネイン発現誘導と神経保護効果. メタルバイオサイエンス研究会 2019, 東京, 2019.10.30.
- 13) 宮崎育子, 浅沼幹人, 村上真樹, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久: ロテノン誘発部位特異的アストロサイト機能不全によるドパミン神経障害へのメタロチオネインの関与. メタルバイオサイエンス研究会 2019, 東京, 2019.10.30.
- 14) 磯岡 奈未, 宮崎 育子, 菊岡 亮, 和田 晃一, 中山 恵利香, 進 浩太郎, 山本 大地, 北村 佳久, 浅沼 幹人: ロチゴチンのアストロサイトセロトニン 1A 受容体を標的としたドパミン神経保護効果. 第 32 回創薬・薬理フォーラム, 岡山, 2019.12.21.
- J. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得、実用新案登録、その他
特になし

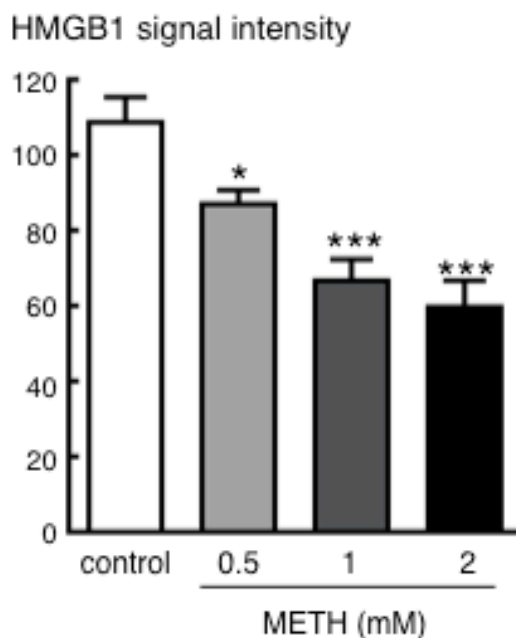
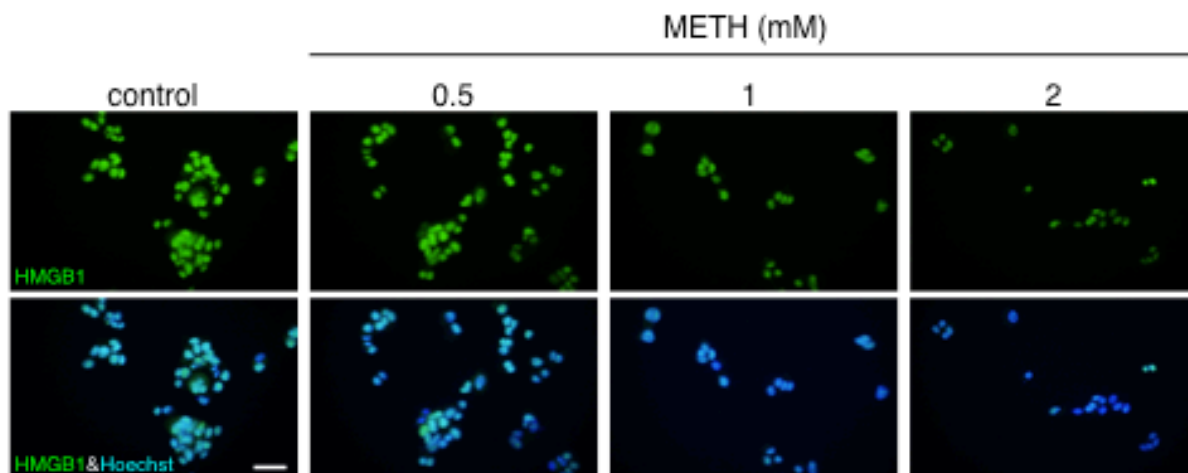


Fig. 1. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to METH (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

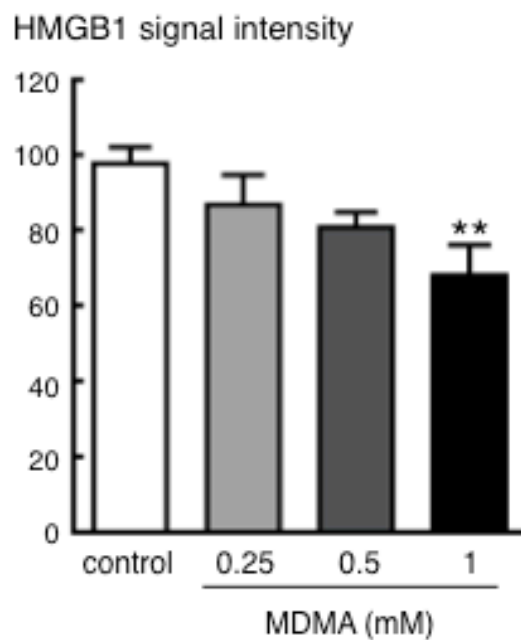
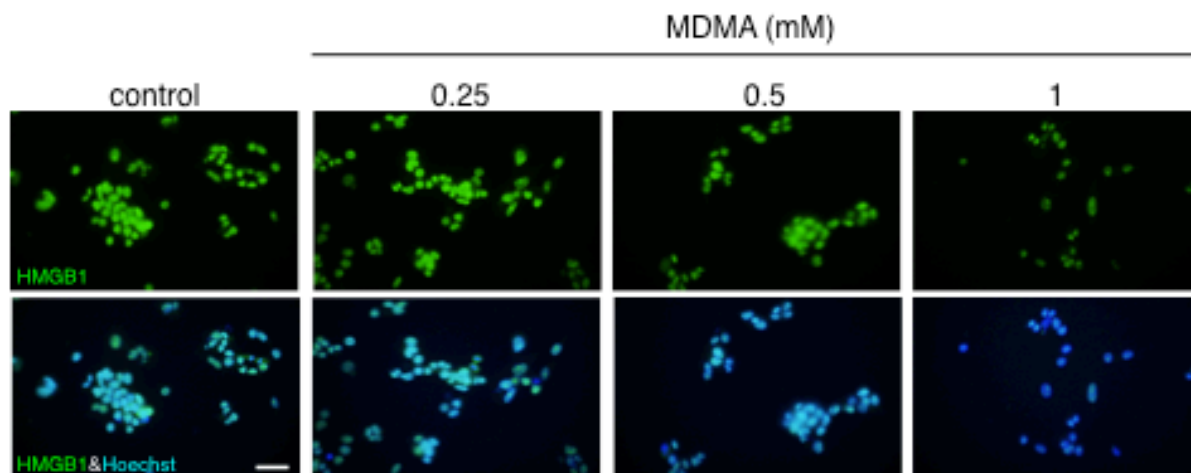


Fig. 2. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to MDMA (final concentration: 0, 0.25, 0.5, 1 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. ** $p < 0.01$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

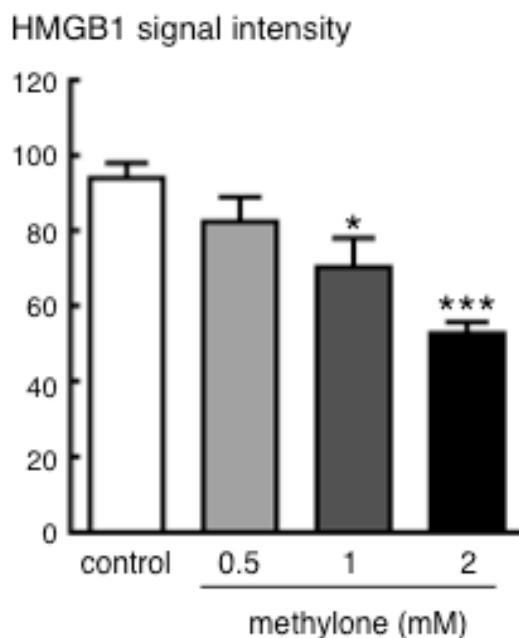
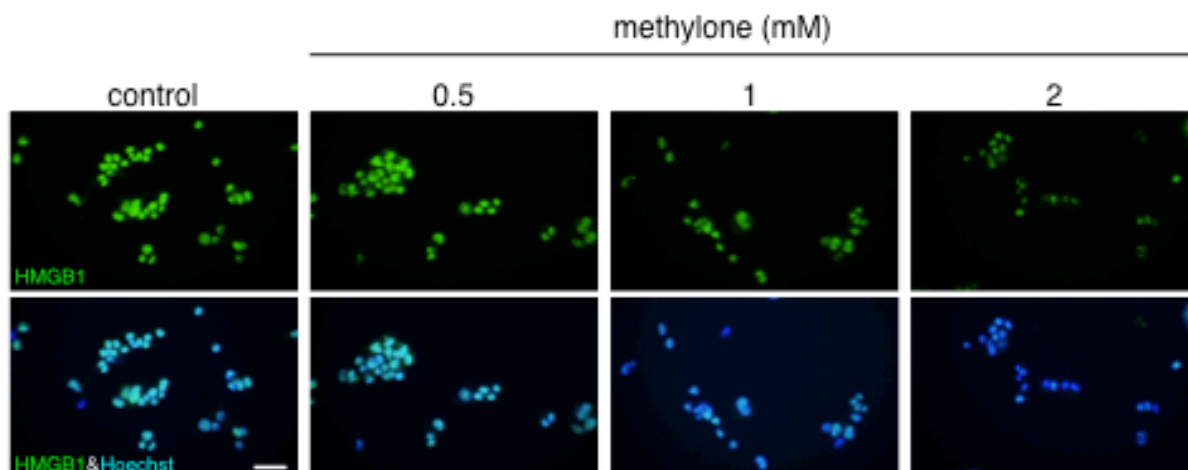


Fig. 3. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to methylone (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. * p <0.05, *** p <0.001 vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

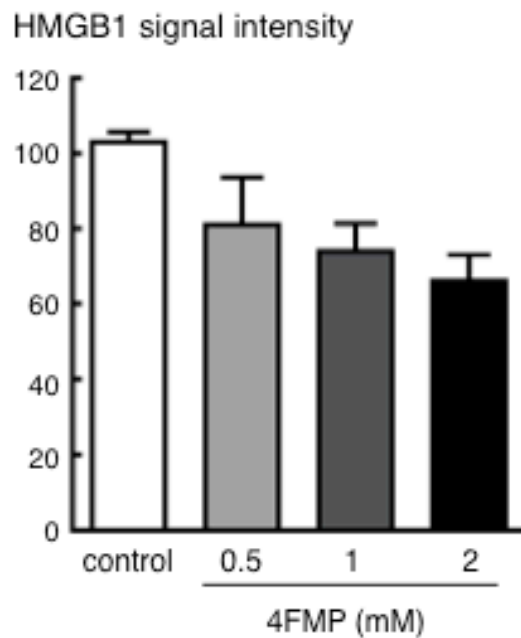
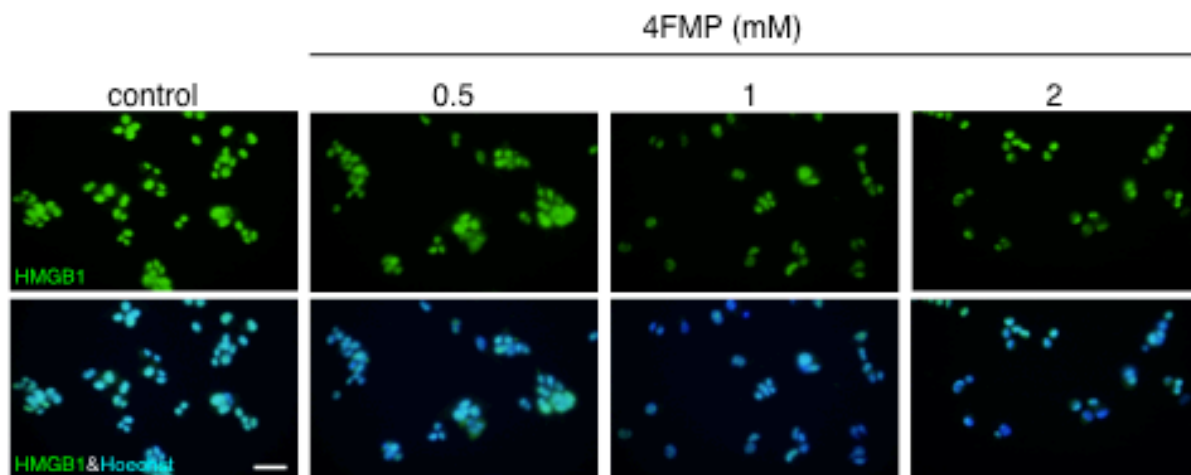


Fig. 4. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to 4FMP (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

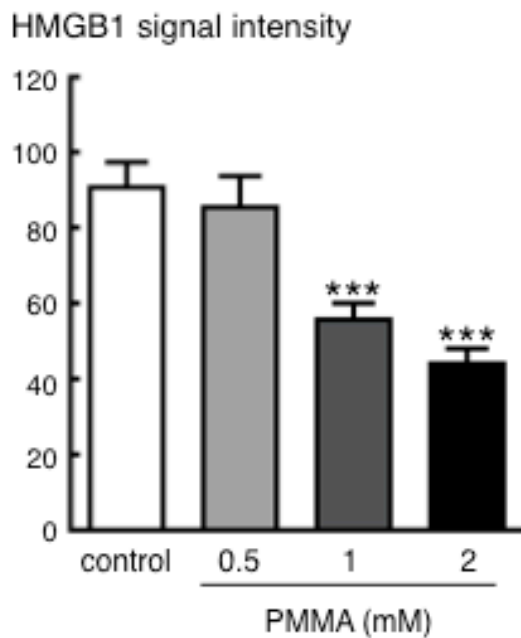
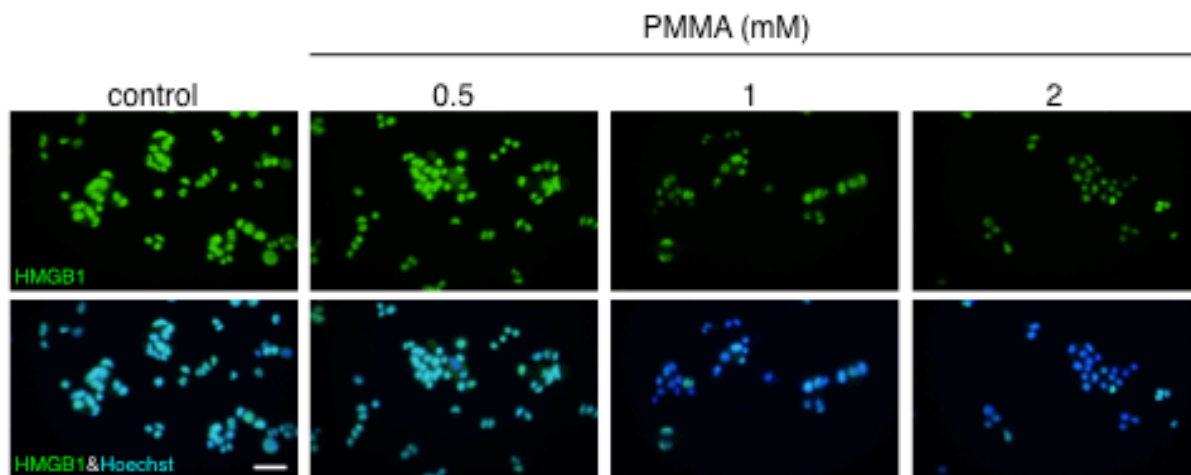


Fig. 5. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to PMMA (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. *** $p < 0.001$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

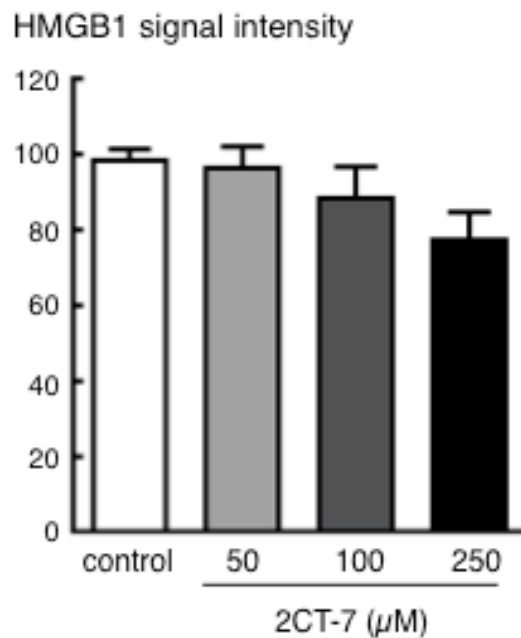
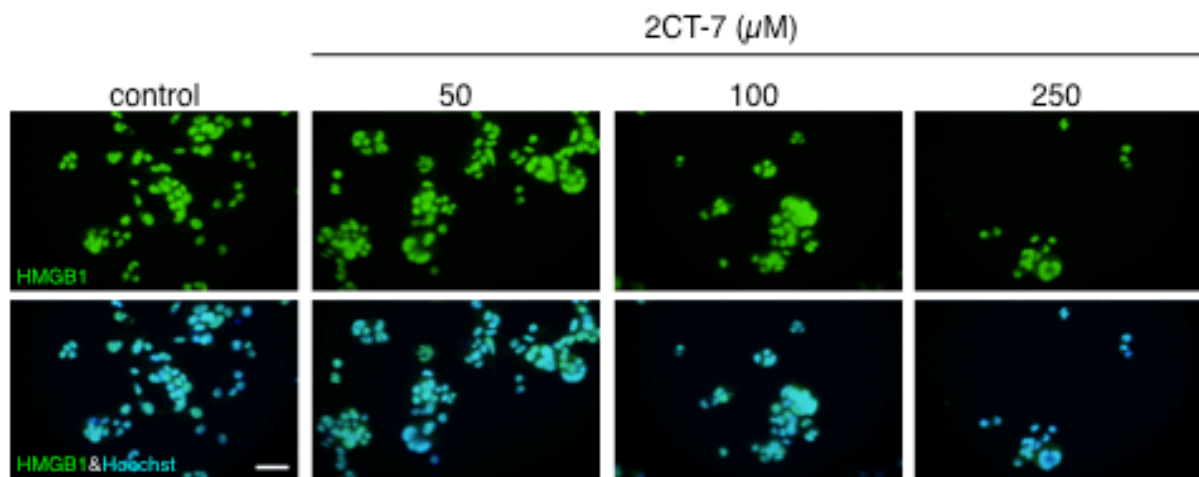


Fig. 6. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to 2CT-7 (final concentration: 0, 50, 100, 250 μM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μm . Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

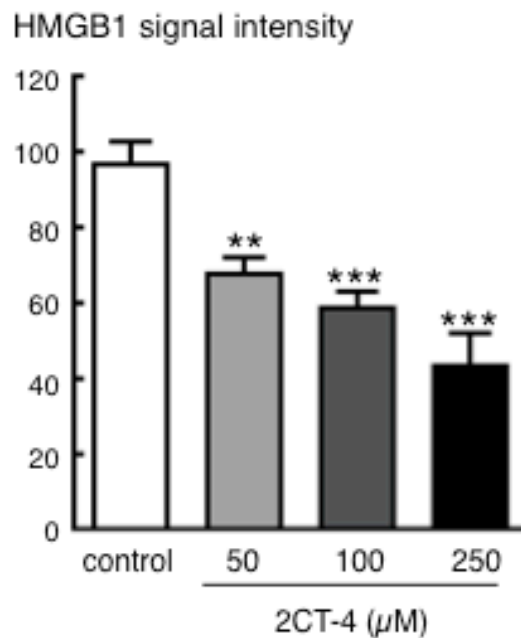
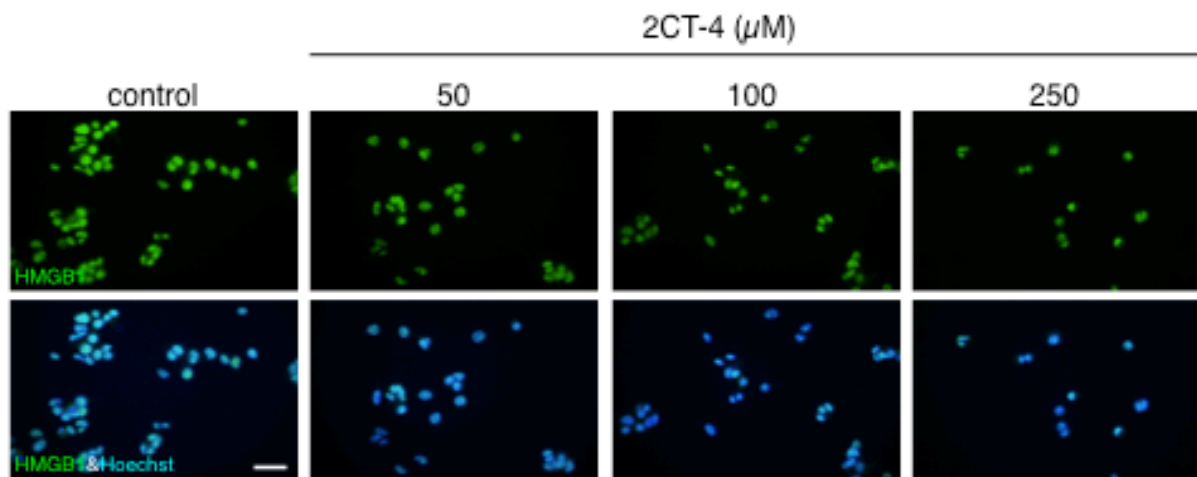


Fig. 7. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to 2CT-4 (final concentration: 0, 50, 100, 250 μM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μm. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

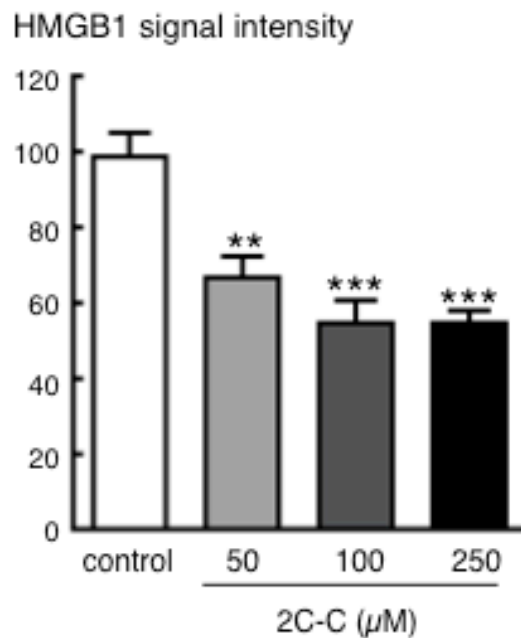
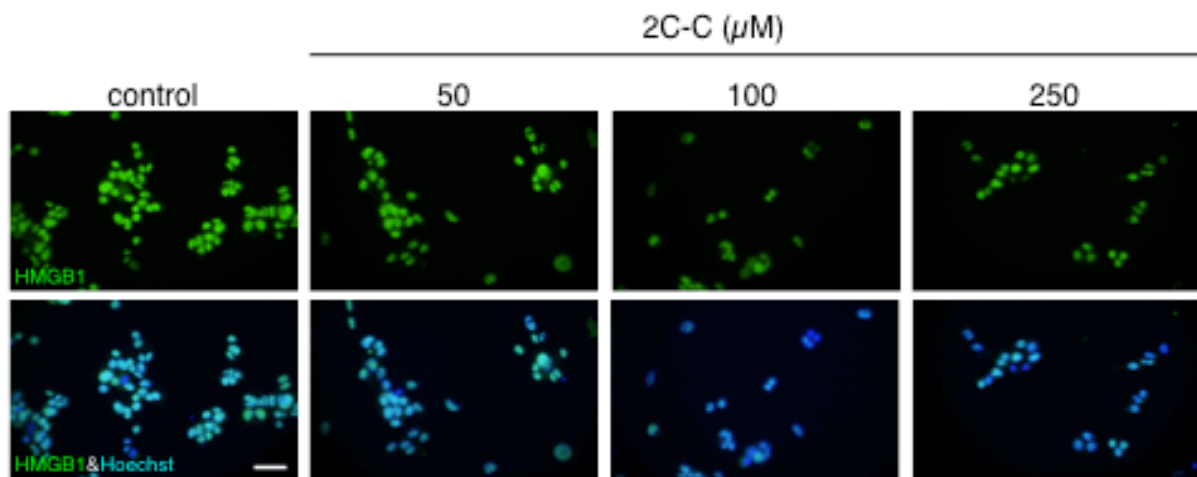


Fig. 8. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to 2C-C (final concentration: 0, 50, 100, 250 μ M) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. ** p <0.01, *** p <0.001 vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

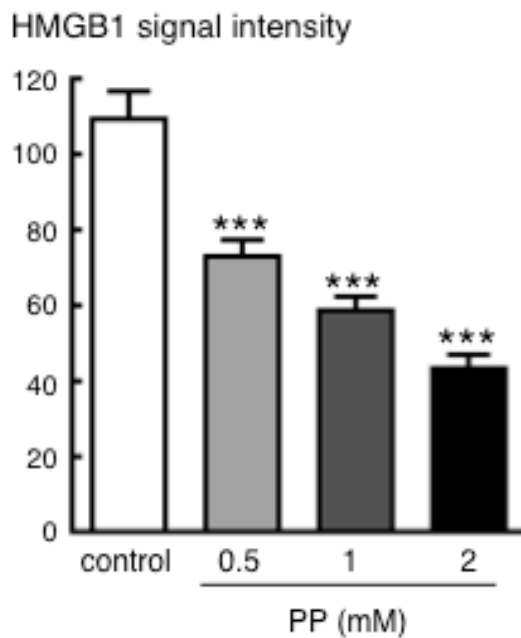
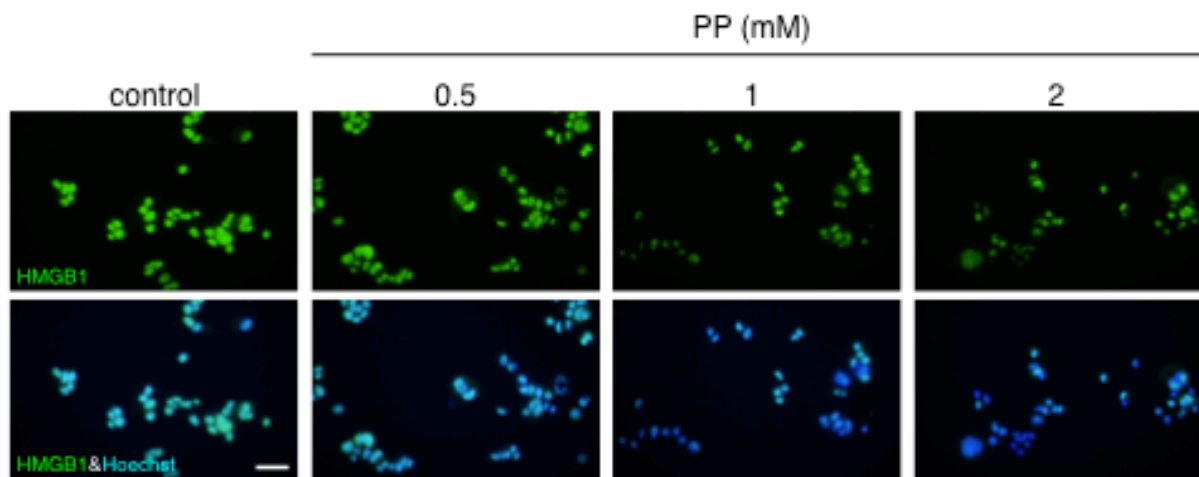


Fig. 9. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to PP (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. *** $p < 0.001$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

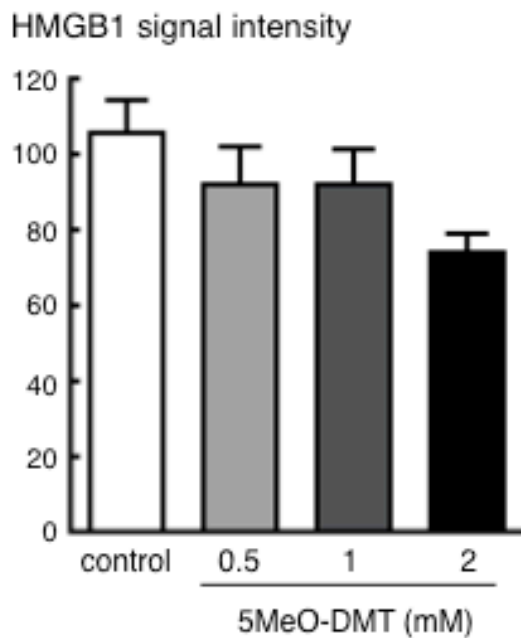
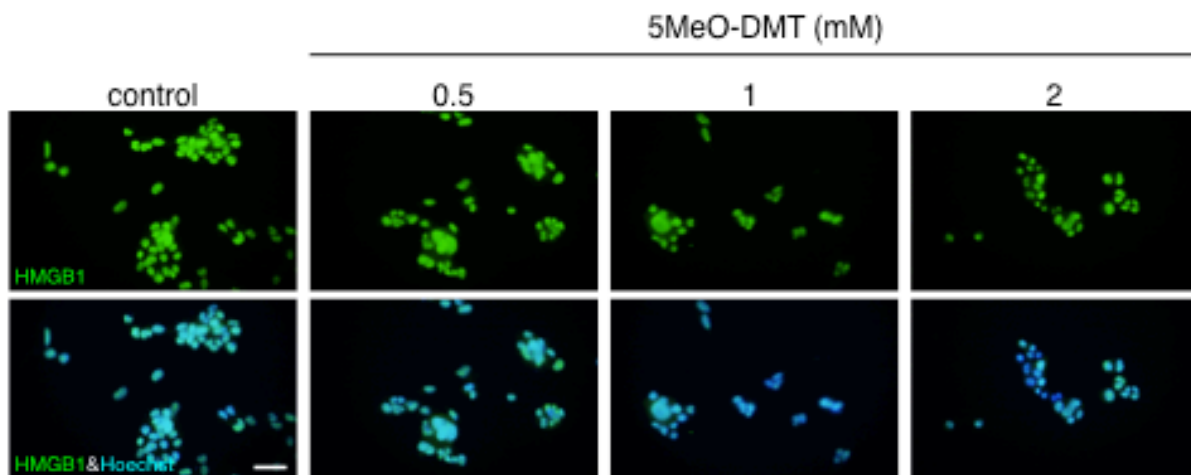


Fig. 10. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to 5MeO-DMT (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

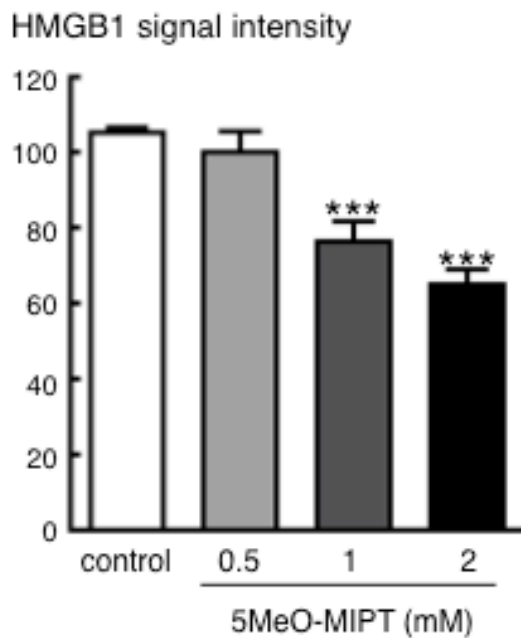
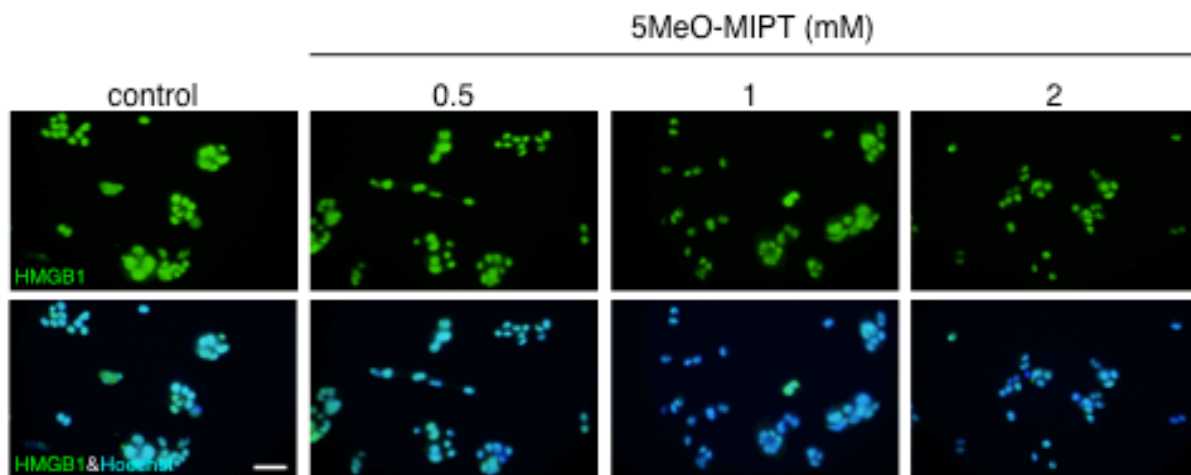


Fig. 11. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to 5MeO-MIPT (final concentration: 0, 0.5, 1, 2 mM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μ m. Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. *** p <0.001 vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

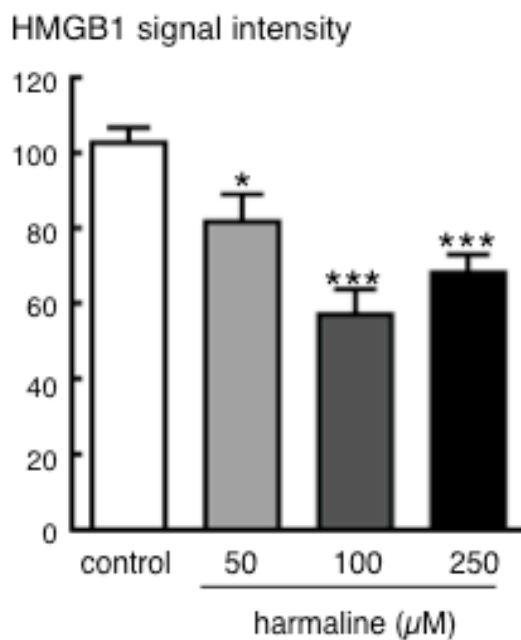
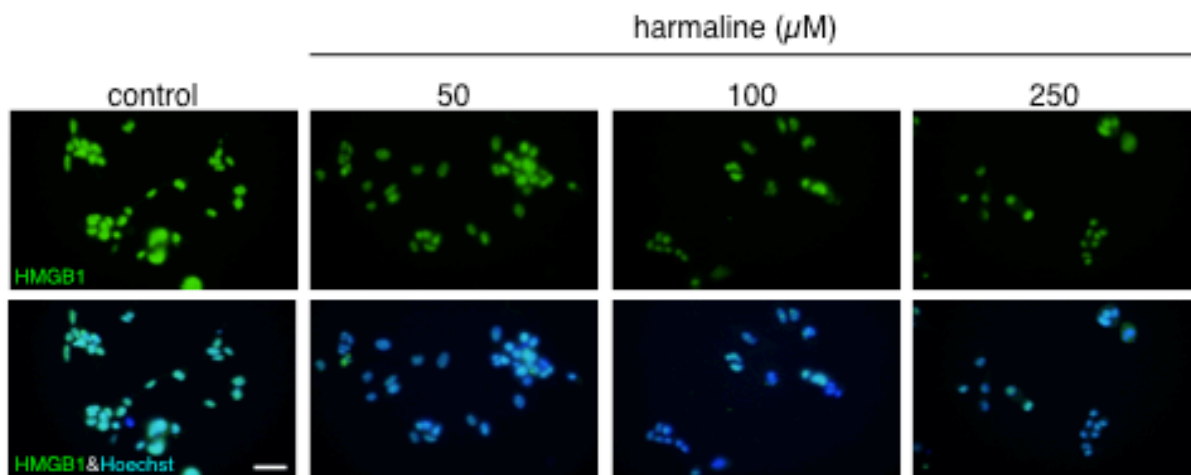


Fig. 12. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to harmaline (final concentration: 0, 50, 100, 250 μM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μm . Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

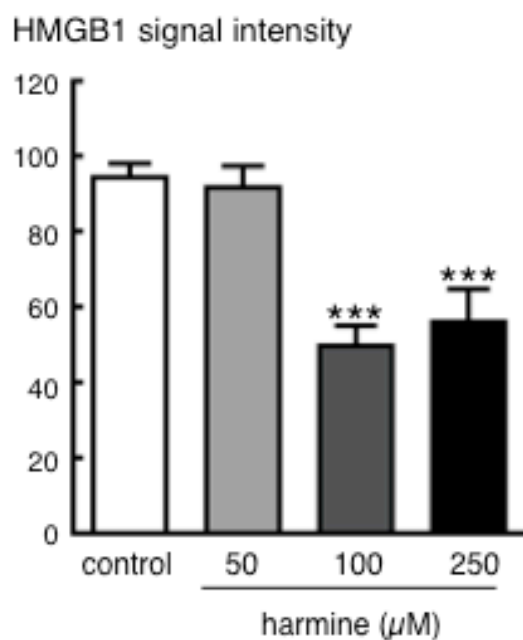
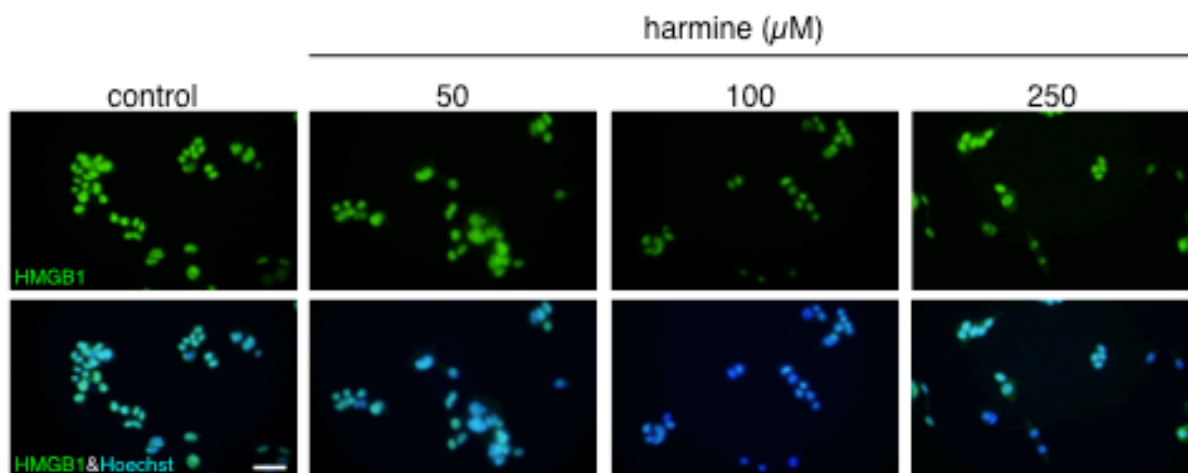


Fig. 13. HMGB1 immunohistochemistry and nuclear staining in B65 cells exposed to harmine (final concentration: 0, 50, 100, 250 μM) for 3 hrs. Top: representative photos of HMGB1 immunohistochemistry (green) and nuclei visualized by incubation with Hoechst33342 dye (blue). Scale bar = 50 μm . Bottom: intensity of HMGB1-immunopositive signals. *** $p < 0.001$ vs. control group. (one-way ANOVA, *post-hoc* Fisher LSD test)

分担研究報告書

危険ドラッグの生体内挙動とその有害性の相関に関する研究

分担研究者：	北市清幸	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	伊藤哲朗	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	首村菜月	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	松久貴哉	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	木下智絵	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	曾田 翠	(岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：	筑本貴郎	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	神山恵理奈	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	永井宏幸	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：	岩木孝晴	(岐阜県保健環境研究所 生活科学部)

【研究要旨】

昨年度より構築された、入手困難な合成カンナビノイド (SCs) 標準品を合成する適時供給体制を活かし、本年度ではこの手法で合成された新規 SCs を用いて、各種の検討を行った。

すなわち、1) 昨年度取り組んだ ATHPINACA 位置異性体識別法の適用拡大を目指すとともに、置換基の違いが代謝挙動に及ぼす影響を調査するため、ATHPINACA の Tail 部の置換基のみが異なる 2 種の SCs (AFUBINACA, ACHMINACA) それぞれのアダマンチル位置異性体を合成し、LCMS-IT-TOF を用いた精密質量分析および *in vitro* 代謝挙動の解明を試みた。また、2) 昨年度までに確立したラットを用いた *in vivo* 代謝実験を用いて、5F-CUMYK-PINACA および CUMYL-PINACA の代謝物に関する排出経路の特定を試みた。また、排出経路としては尿および胆汁を検討し、それぞれの適切なサンプル処理方法および LC-MS-IT-TOF を用いた検出技術の確立を目指した。

さらに、3) 構造識別上、喫緊の課題とされる芳香環フッ素置換体の異性体識別に関する基礎研究の一環として、新たにエレクトロスプレーイオン化 (ESI) タンデム型質量分析装置(QqQ)を用いて、SCs 位置異性体 (FUB-JWH-018 とその異性体) の識別を行った。

1) の検討により、HLMs による *in vitro* 代謝半減期および Tail 部への代謝反応は化合物ごとに大きく異なっていたが、全てにおいてその主要な代謝経路はアダマンチル基への水酸基付加であった。一方、主要代謝物は位置異性体間で異なっており、isomer 1 はアダマンチル基の二水酸化体、isomer 2 は一水酸化体であることが明らかとなった。また、未変化体および主要代謝物のプロトン化分子から生成される MS² スペクトルには明確な違いが見られ、isomer 1 からのみアダマンチル基を示すプロダクトイオンが強い相対強度で得られた。以上の結果より、アダマンチル位置異性体は LC-MS-IT-TOF を用いた精密質量分析と MS² スペクトルにおけるプロダクトイオンの比較により、未変化体、主要代謝物いずれにおいても明確に識別可能であることが示唆された。

2) の結果、5F-CUMYK-PINACA、CUMYL-PINACA とともに、未変化体および代謝物の尿中からの検出は難しいことが明らかとなり、尿中への排泄量は少ないことが考えられた。一方、胆汁中からは両化合物の未変化体と代謝物の検出が可能であり、両化合物の主要な排泄経路としては

胆汁である可能性が示唆された。現在、糞便中における代謝物の検出について検討中である。

また3)では、3種のフッ素位置異性体(オルト、メタ、及びパラ置換体)について、プロトン化イオンをプリカーサーイオンとして広範囲のコリジョンエネルギー(CE)条件下、識別上鍵となるプロダクトイオンを探索した。CE 80eVにおいて得られた主要フラグメントについて、多変量解析を組み合わせるにより、識別に資する二種のプロダクトイオンを特定した。得られた評価系は、他の位置異性体識別にも適用可能であった。

以上の知見は、摂取SCsおよびその代謝物の識別技術確立に技術的基盤として極めて有用であり、今後の効率的なSCsの法的規制においても有用であることが考えられた。

A. 研究目的

危険ドラッグに含まれる成分にはカチノン類や合成カンナビノイド(SCs)等が知られている。国はこれらについて法律による規制を行っているが、その構造の一部を変えた指定薬物対象外の新規化合物が次々と出現する、いわゆる“イタチごっこ”の状況が続いてきた¹⁾。また、SCsは未変化体が尿などの生体試料から検出困難であることが知られており²⁾、既報のSCs代謝実験において、*in vitro*代謝と*in vivo*代謝の結果は完全には一致しないことも指摘されている³⁾。従って、*in vivo*動物実験モデルは、実際の生体内におけるSCs代謝をより正確に予測するために重要である。そして、両者の実験における代謝物を明らかにし、その代謝プロファイルの情報を蓄積することは、SCsの摂取を裏付けるエビデンスとして有用であると考えられる。現在、SCsの使用は下火になってきたと言われているが、海外において電子タバコに装填するe-liquid中にアミド型のSCsの存在が確認されている。本研究では、これらアミド型SCsの中で、今後日本にも流通する可能性が否定できないアダマンチル位置異性体3種を用いた*in vitro*代謝実験(Fig. 1)および5F-CUMYL-PINACAとその構造類似物質CUMYL-PINACAを用いた*in vivo*代謝実験における、未変化体および代謝物の検出技術の確立並びに代謝挙動の解明を試みた。

指定薬物として規制されるSCsの異性体は規制対象外であることが多く、通常の検査で使用するLC-PDA、LC-MS及びGC-MSのみでは異性体間の識別が困難な場合がある。化学構造の識別上とりわけ問題視される化合物は、芳香環上にフッ素原子を導入した誘導体である。近年、SCsの骨格を形成するインドール環やインダゾール環の窒素

にフルオロベンジル基が結合した化合物が指定薬物に指定されているが、化合物の同定と構造識別に必要とされる標準品の整備は不十分であり、加えて機器分析による物理化学的データに関する情報が不足している。本研究では、インドール環の1位にパラフルオロベンジル基を持つナフトイルインドール型の合成カンナビノイドFUB-JWH-018を対象として、フッ素の結合位置の異なる異性体のESI-QqQ-MSによる識別について検討した。また、多種多様な合成カンナビノイドの分析に対応するため、フラグメントライブラリー整備による化合物の適時供給体制を整えるとともに、国内の検出動向を反映した化合物選定と異性体モデル化合物の合成を進め、合成カンナビノイドの代謝物測定系(*in vitro*, *in vivo*)の開発に資することを旨とした。

B. 研究方法

1. 肝ミクロソーム画分を用いた*in vitro*代謝実験

薬物の代謝反応はErraticoらの方法⁴⁾に一部改良を加えて行った。

氷上にて、100 mM リン酸 buffer (pH 7.4) 900 μ L に、HLMs 終濃度 0.5 mg/mL (XenoTec, Kansas, USA)、NADPH Regeneration System Solution A 50 μ L、Solition B 10 μ L (Corning, USA)、UDPGA 終濃度 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)、alamethicin in DMSO 終濃度 10 μ g/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を添加し、全量を 990 μ L とした。

この混液を、5 分間のプレインキュベートした後、対象となるSCsを終濃度 10 μ M となるように 10 μ L 添加後、37 $^{\circ}$ C の水浴で 3 時間までインキュベートを行った。

1-1. 経時サンプルの作製

各タイムポイント(0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180分)の混液を200 µL採取し、内部標準物質であるパパベリン 0.01 µg/mL (日医工, 富山)を含有するアセトニトリル溶液(4°C)を1200 µL添加し、代謝反応を停止させた。得られたサンプルは、遠心(12,000 rpm, 10 min)し、上清を45°Cで遠心乾固し、超音波処理のもとで80 µLの50%アセトニトリルに再溶解した。その後、フィルター濾過したものを測定に用いた。

2. SCsの合成

in vitro 代謝実験用として、AFUBINACA および ACHMINACA それぞれのアダマンチル位置異性体、*in vivo* 代謝実験用として CUMYL-PINACA および 5F-CUMYL-PINACA を合成した。各々の化学構造は核磁気共鳴分光法(NMR)により得られた情報を元に決定した。

3. ラットを用いた *in vivo* 代謝実験

頸静脈、膀胱、胆管をカテーテル処理した14週齢の雄のWistar/STラット(SLC、日本)を用いた。

3-1. *in vivo* サンプルの作製

尿と胆汁ともに、薬物投与前10分間のサンプルを収集し、ブランクサンプルとした。

尿のサンプル処理について、尿量1 mLに対してβ-グルクロニダーゼ 176 µL 加え、加水分解処理を行った。次に、加水分解処理を行ったサンプルから1000 µLを蓋付き試験管に分取し、そこにクロロホルム:イソプロパノール=3:1(v:v)を2000 µL加えて除タンパクした。内部標準物質を加えたのち遠心分離(36000 rpm, 20 min)し、有機層を新しい試験管に移したのちに50°Cで窒素乾固した。測定前に50%アセトニトリルで再溶解し、フィルターろ過したものを測定に用いた。

胆汁サンプルについて、胆汁300 µLに対して、β-グルクロニダーゼ 52.8 µL 加え、加水分解処理を行った。その後、アセトニトリル1200 µLを加えて除タンパクし、遠心(12000 rpm, 10 min)したのち、上清をQuEChERS処理した⁵⁾。処理後、遠心(12000 rpm, 10 min)し、上清を45°Cで遠心乾固

した。測定前に50%アセトニトリルで再溶解しフィルターろ過したものを測定に用いた。

4. 分析条件

それぞれの合成カンナビノイドおよびその代謝物の分析には、LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto)、LCカラムにはZORBAX Eclipse Plus C8 2.1×150 mm, 3.5 µmを使用した。

移動相には、(A) 0.1% formic acid in water および(B) 0.1% formic acid in acetonitrileを用い、グラジエントの条件は、(B) 0-2 min : 10%、2-40 min: 10→90%、40-48 min : 10%とし、測定時間は48分に設定した。また、カラム温度は40 °C、流速は0.18 mL/minとし、測定サンプルのインジェクト量は5 µLとして測定を行った。LCMS-IT-TOFは、イオン化法として positive electrospray ionization (ESI) 法を用い、測定範囲を *m/z* 100-700として測定を行った。なお、イオン蓄積時間は40 msecとした。また、各プリカーサーアイソレーション幅は1 Daとし、周波数は45.0 kHz、CIDエネルギーは100%で測定を行った。

5. データ解析

代謝物と考えられる溶出ピークから得られたMS²スペクトルのデータより、その構造を推定した。また、代謝物は溶出時間の早いものから順に命名した。最終的にすべての代謝物は以下の基準を満たすことを確認した。

- ① ブランクサンプル中に存在しない。
- ② 他の代謝物の同位体ではない。
- ③ プリカーサーイオンの精密質量が理論値から5 ppm範囲内である。
- ④ プロダクトイオンがプリカーサーイオンの部分構造として推定可能である。

C. 研究結果

1. アダマンチル位置異性体の識別法開発および *in vitro* 代謝経路の推定

AFUBINACA および ACHMINACA はATHPINACAのTail部がそれぞれフルオロベンジル基またはシクロヘキシルメチル基に置換された、アダマンチル基の位置異性体を持つSCsである(Fig. 1)。これらの未変化体においては、位置

異性体間の溶出時間による差は小さく、LC のみによる分離は困難であったが、そのプロトン化分子から生成されるプロダクトイオンには明確な違いが見られ、isomer 1 ではアダマンチル基を、isomer 2 ではインダゾール骨格を示すものが得られた (Figs. 2 and 3)。HLMs を用いた *in vitro* 代謝実験から推定された主要代謝経路は、全ての SCs においてアダマンチル基への迅速な水酸基付加であったが、代謝反応 3 時間後の主要代謝物は位置異性体間で異なり、isomer 1 ではアダマンチル基の二水酸化体、isomer 2 では一水酸化体であることが明らかとなった (Figs. 4 and 5)。また、主要代謝物の MS² スペクトルには未変化体と同様の明確な違いが見られ、isomer 1 からのみアダマンチル基を持つプロダクトイオンが強い相対強度で検出された (Figs. 6 and 7)。さらに、未変化体の HLMs による代謝半減期は化合物ごとに大きく異なり、ATHPINACA isomer 1 (4.4 ± 0.8 min) が最も短く、AFUBINACA isomer 2 (63.4 ± 1.8 min) が最も長い値となった。また、AFUBINACA 位置異性体のいずれの代謝物においても Tail 部への代謝反応は見られなかったが (Fig. 4)、ACHMINACA 位置異性体においては、Tail 部またはインダゾール骨格への水酸化を受けた代謝物が検出された (Fig. 5)。

2. *in vivo* 実験における代謝挙動の解析

尿サンプルについて、5F-CUMYL-PINACA (n=10) および CUMYL-PINACA (n=21) で、未変化体と代謝物のピークは検出限界以下であった。

胆汁サンプルについて、5F-CUMYL-PINACA で未変化体と代謝物が検出された (Fig. 8)。特に多く検出することができたのは、一水酸化体であった (Fig. 9)。CUMYL-PINACA においても未変化体と代謝物が検出された (Fig. 10)。CUMYL-PINACA は突出したピークはなく、一定のピークで検出された (Fig. 10)。

D. 考察

アダマンチル位置異性体 SCs における *in vitro* 代謝研究では、昨年度開発に取り組んだ ATHPINACA 位置異性体識別法の適用性を、AFUBINACA および ACHMINACA を用いた比較

検討結果から実証したとともに、Tail 部の置換基の違いが代謝挙動に及ぼす影響を明らかにした。

全ての SCs において観察された、他の代謝部位と比較してアダマンチル基への迅速な水酸基付加が優先的に進む代謝挙動は、5F-AKB-48 を用いた同様の代謝実験においても確認されている⁶⁻⁸⁾ことから、Tail 部の置換基に関係なくアダマンチル基を持つ SCs 全てに共通する特徴であることが考えられた。

また、isomer 2 においては主要代謝物がアダマンチル基の一水酸化体であり、それ以降の代謝反応が進行しにくいことから、アダマンチル基が水酸基付加を受ける特定の部位が、位置異性体間の代謝挙動の違いに関与している可能性が示唆された。

両化合物の未変化体および主要代謝物から得られるプロダクトイオンの明確な違いには、アダマンチルカチオンの安定性が寄与していると考えられる。プロダクトイオンとして、isomer 1 では第 3 級、isomer 2 では第 2 級カルボカチオンを形成する。第 3 級カルボカチオンは、電子供与性である周囲のメチレン基との超共役構造をとるため安定化に有利である⁹⁾。そのため、isomer 1 ではアダマンチルカチオンがインダゾール骨格よりも格段に検出されやすく、isomer 2 では安定化を受けにくいアダマンチルカチオンに比して、イオン化を受けたインダゾール骨格由来のプロダクトイオンがより大きな相対強度で検出されたと考えられる。したがって、昨年度開発されたプロダクトイオンの比較による ATHPINACA 位置異性体の識別法は、Tail 部の置換基が異なる他の SCs にも適用可能であることが示唆された。

AFUBINACA 位置異性体の半減期は ATHPINACA および ACHMINACA 位置異性体に比して長時間であった。この違いには Tail 部の置換基の化学構造が影響していると考えられる。既報においてフルオロベンジル基はいずれの代謝反応も受けないことが報告されており (e.g., FDU-PB-22 and FUB-PB-22¹⁰⁾, and AB-FUBINACA¹¹⁻¹³⁾)、本研究の結果からも AFUBINACA の Tail 部であるフルオロベンジル基は代謝的に安定であった。したがって、フルオロベンジル基は AFUBINACA の代謝抵抗性に大きく寄与すると考えられることから、AFUBINACA は未変化体の

まま生体内で長時間残存する可能性が示唆された。

また、既報においては ACHMINACA の Tail 部であるシクロヘキシルメチル基への2つの水酸基付加^{4, 14)} やカルボニル化^{14, 15)} が報告されているが、本研究においては観察されなかった。既報においてもこれらの代謝物はマイナーであったことから、ACHMINACA においては検出限界以下の代謝物であったと考えられる。

今後、本研究において開発されたアダマンチル位置異性体の識別法を応用していくことで、新たに出現し得る規制外の新規 SCs の摂取証明に資するデータを蓄積できることが期待される。

ラットを用いた *in vivo* 代謝研究では、2種の SCs の未変化体および代謝物の主要な排泄経路が明らかとなった。CUMYL-PINACA および 5F-CUMYL-PINACA の未変化体および主要代謝物は尿中よりも胆汁中から多く検出され、グルクロン酸抱合体を排泄するトランスポーターが複数存在する胆汁排泄が主要な排泄経路である可能性が示唆された。また、ペンチル鎖の C 末端へのフッ素の導入により、生成される代謝物の傾向に違いが見られたことから、フッ素の導入が代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。

E. 結 論

今回の一連の研究により、アダマンチル基を持つ SCs の位置異性体識別法を確立したとともに、Tail 部の異なる SCs の代謝プロファイルをさらに蓄積することが出来た。したがって、今後同法を応用し、摂取マーカーとなりうる代謝物を特定することで、新規 SCs の素早い法的規制や薬物乱用者の摘発に貢献をすることが期待される。

さらに、本研究より明らかとなった SCs の胆汁排泄の可能性を踏まえ、今後は糞便における代謝物の検出についても検討を進めていく予定である。

F. 参考文献

1) Kikura-hanajiri R 危険ドラッグの法規制と流通実態変化. 日本薬理学雑誌 150:129–134, 2017

- 2) Diao X, Huestis MA New synthetic cannabinoids metabolism and strategies to best identify optimal marker metabolites. *Front Chem* 7:1–15, 2019
- 3) Kevin RC, Lefever TW, Snyder RW, et al In vitro and in vivo pharmacokinetics and metabolism of synthetic cannabinoids CUMYL-PICA and 5F-CUMYL-PICA. *Forensic Toxicol* 35:333–347, 2017
- 4) Erratico C, Negreira N, Norouzzadeh H, et al In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Drug Test Anal* 7:866–876, 2015
- 5) Hasegawa K, Minakata K, Gonmori K, et al Identification and quantification of predominant metabolites of synthetic cannabinoid MAB-CHMINACA in an authentic human urine specimen. *Drug Test Anal* 10:365–371, 2018
- 6) Vikingsson S, Josefsson M, Gréen H Identification of AKB-48 and 5F-AKB-48 metabolites in authentic human urine samples using human liver microsomes and time of flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 39:426–435, 2015
- 7) Holm NB, Pedersen AJ, Dalsgaard PW, Linnet K Metabolites of 5F-AKB-48, a synthetic cannabinoid receptor agonist, identified in human urine and liver microsomal preparations using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal* 7:199–206, 2015
- 8) Diao X, Huestis MA Approaches, Challenges, and Advances in Metabolism of New Synthetic Cannabinoids and Identification of Optimal Urinary Marker Metabolites. *Clin Pharmacol Ther* 101:239–253, 2017
- 9) Rasul G, Olah GA, Prakash GKS Density functional theory study of adamantanediyldications C10H142+ and protio-adamantyl dications C10H162+. *Proc Natl Acad Sci* 101:10868–10871, 2004
- 10) Diao X, Scheidweiler KB, Wohlfarth A, et al In Vitro and In Vivo Human Metabolism of Synthetic Cannabinoids FDU-PB-22 and FUB-PB-22. *AAPS J* 18:455–464, 2016
- 11) Vikingsson S, Gréen H, Brinkhagen L, et al Identification of AB-FUBINACA metabolites in authentic urine samples suitable as urinary markers of drug intake using liquid chromatography quadrupole tandem time of flight mass spectrometry. *Drug Test Anal* 8:950–956, 2016
- 12) Castaneto MS, Wohlfarth A, Pang S, et al Identification of AB-FUBINACA metabolites

- in human hepatocytes and urine using high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicol* 33:295–310, 2015
- 13) Takayama T, Suzuki M, Todoroki K, et al UPLC/ESI-MS/MS-based determination of metabolism of several new illicit drugs, ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, 5F-QUPIC and α -PVT, by human liver microsome. *Biomed Chromatogr* 28:831–838, 2014
- 14) Franz F, Angerer V, Moosmann B, Auwärter V Phase I metabolism of the highly potent synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and detection in human urine samples. *Drug Test Anal* 9:744–753, 2017
- 15) Carlier J, Diao X, Sempio C, Huestis MA Identification of New Synthetic Cannabinoid ADB-CHMINACA (MAB-CHMINACA) Metabolites in Human Hepatocytes. *AAPS J* 19:568–577, 2017

15) 2.学会発表

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Chikumoto T, Kadomura N, Matsuhisa T, Kawashima H, Kohyama E, Nagai H, Soda M, Kitaichi K, Ito T. Differentiation of FUB-JWH-018 positional isomers by electrospray ionization–triple quadrupole mass spectrometry. *Forensic Chemistry* 13, Doi.org/10.1016/j.forc.2019.100157

2.学会発表

- 1) Natsuki Kadomura, Hidenobu Kawashima, Takaya Matsuhisa, Midori Soda, Erina Kohyama, Takao Chikumoto, Hiroyuki Nagai, Tetsuro Ito, Kiyoyuki Kitaichi. The isomeric discrimination and investigation of the metabolic profiles of synthetic cannabinoids. ASEAN INTERNATIONAL CONGRESS NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 2019, Yogyakarta, Indonesia, 2019年2月28日-3月2日
- 2) 松久貴哉, 川島英頌, 首村菜月, 曾田翠, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 伊藤哲朗,

北市清幸. 第三世代合成カンナビノイドの代謝挙動に関する研究. 第38年会日本法中毒学会, 博多, 2019年7月26日-7月27日

- 3) 岩木孝晴, 神山恵理奈, 永井宏幸, 筑本貴郎, 曾田翠, 原英彰, 北市清幸, 伊藤哲朗. 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会における官学連携による基礎研究と地域啓発への展開について. 第56回全国衛生化学技術協議会年会, 広島, 2019年12月5-6日.
- 4) 伊藤哲朗, 岩木孝晴, 神山恵理奈, 首村菜月, 松久貴哉, 木下智絵, 曾田翠, 永井宏幸, 松永俊之, 原英彰, 北市清幸. 岐阜危険ドラッグ解析技術連携協議会の取り組みについて (第四報) 産学連携による基礎研究と地域啓発について. 第52回東海薬剤師学会, 四日市, 2019年12月1日.

3.その他

- 1) 伊藤哲朗, 神山恵理奈, 筑本貴郎, 永井宏幸, 岩木孝晴, 多田裕之, 古川諒一, 川島英頌, 首村菜月, 松久貴哉, 曾田翠, 北市清幸. 指定薬物の同定を目指した基礎研究. 岐阜県保健環境研究所報, 第27号, 33-38, 2019.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

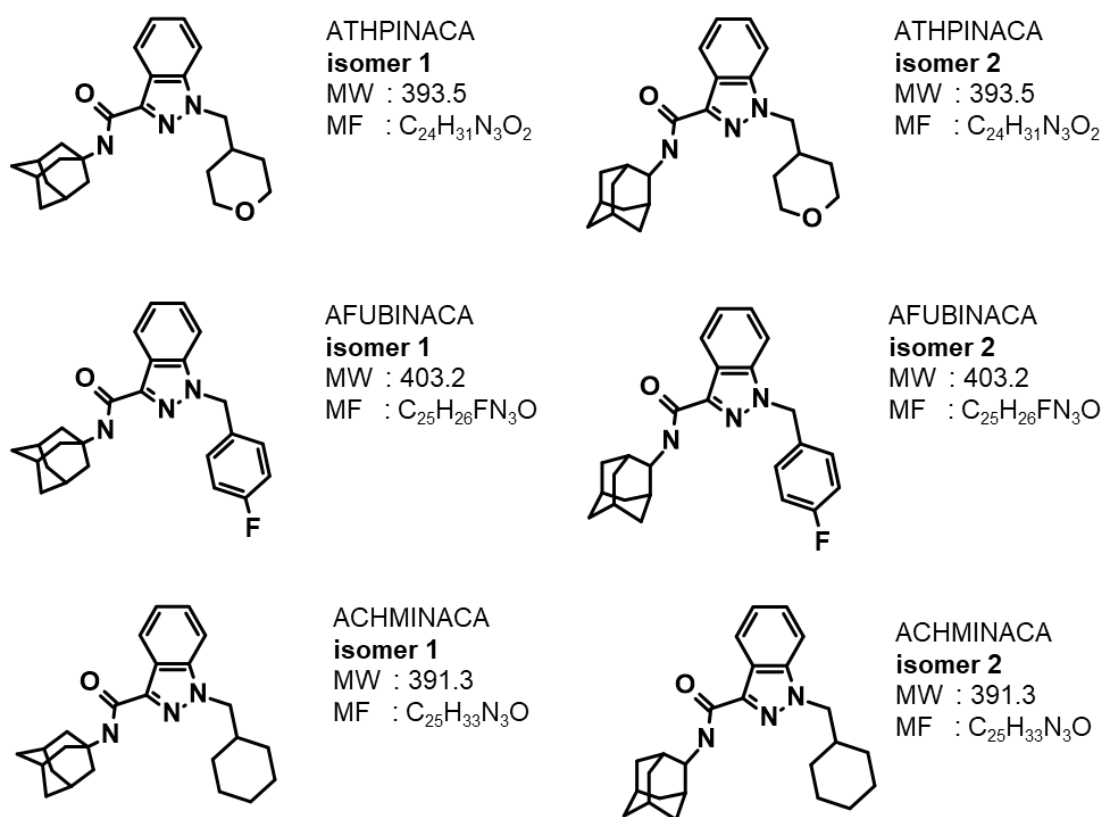


Fig. 1 The chemical structures of the compounds investigated in this *in vitro* study

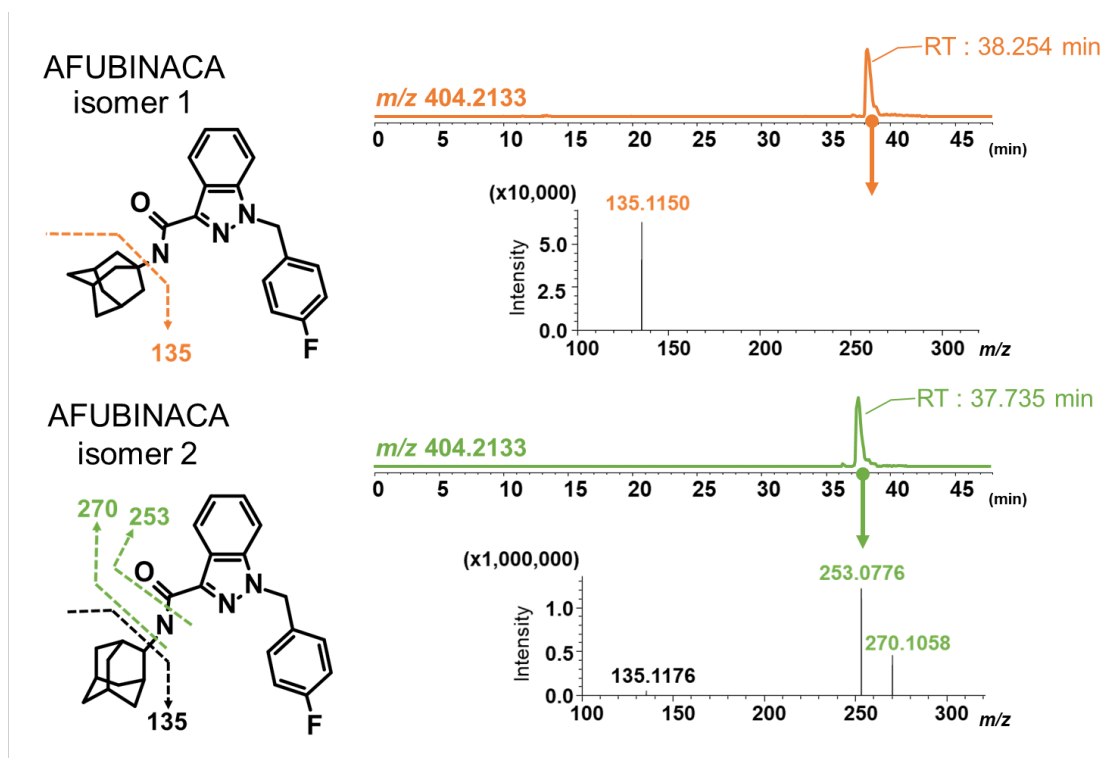


Fig. 2 EICs and MS² spectra for AFUBINACA isomers

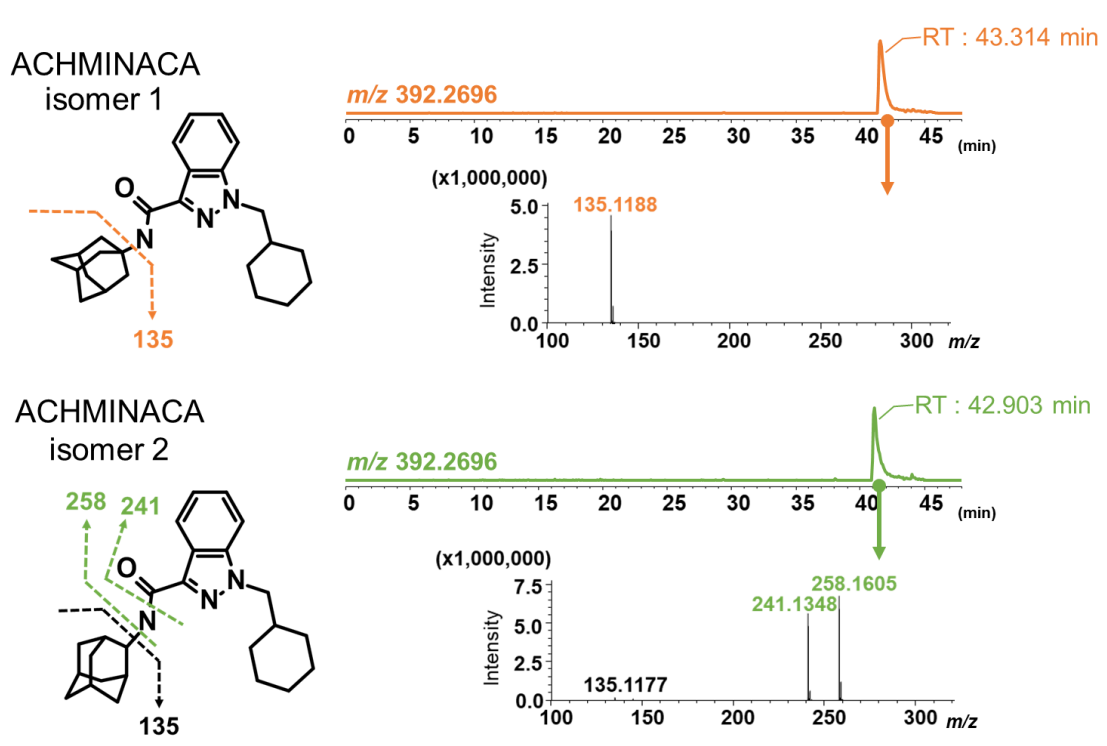


Fig. 3 EICs and MS² spectra for ACHMINACA isomers

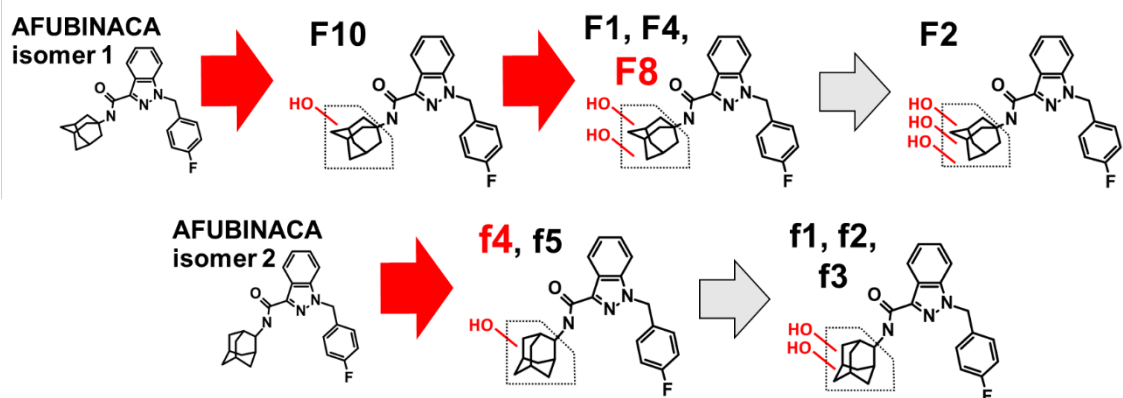
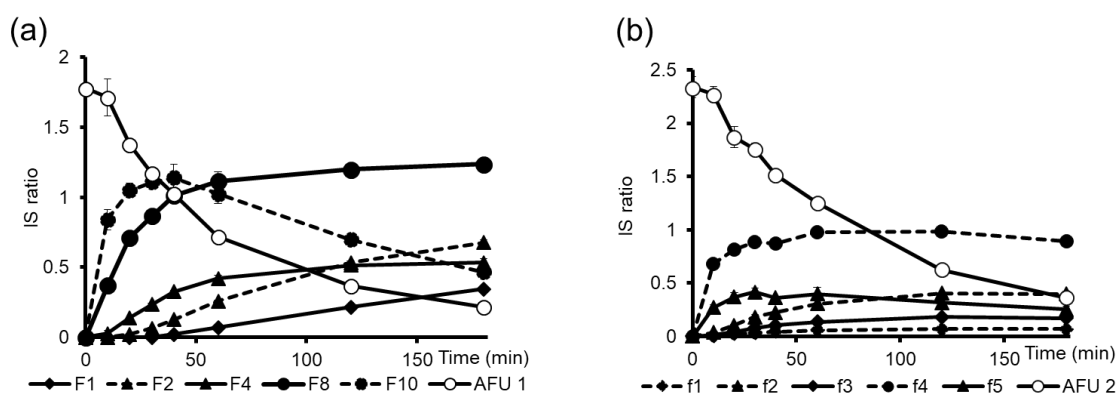


Fig. 4 Production of the metabolites of AFUBINACA (a: isomer 1, b: isomer 2) and proposed metabolic pathways

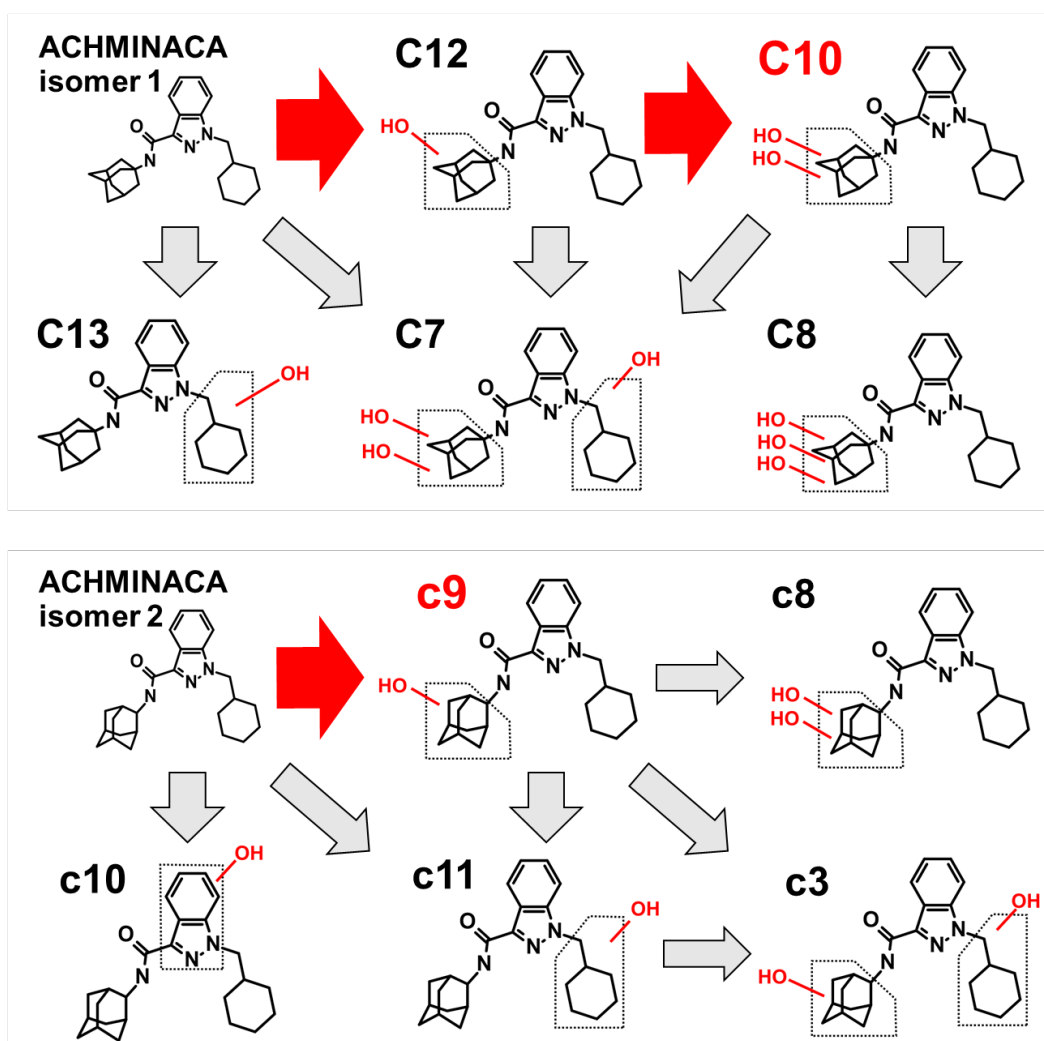
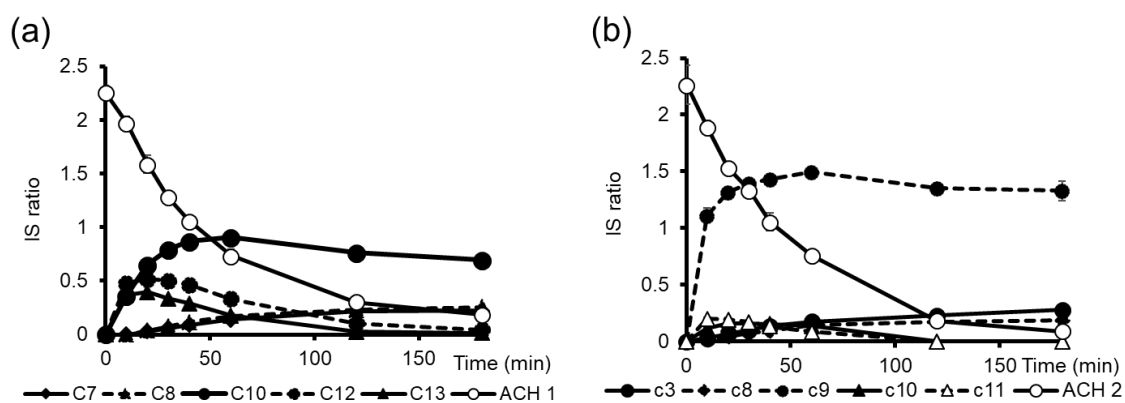


Fig. 5 Production of the metabolites of ACHMINACA (a: isomer 1, b: isomer 2) and proposed metabolic pathways

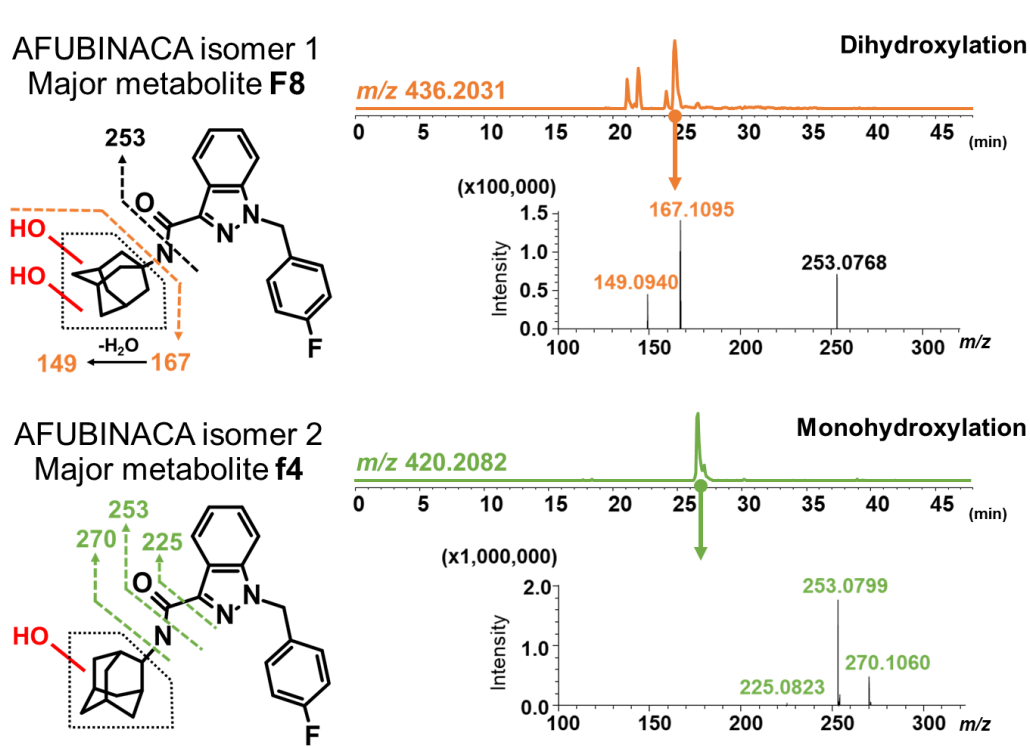


Fig. 6 EICs and MS² spectra for the major metabolites of AFUBINACA isomers

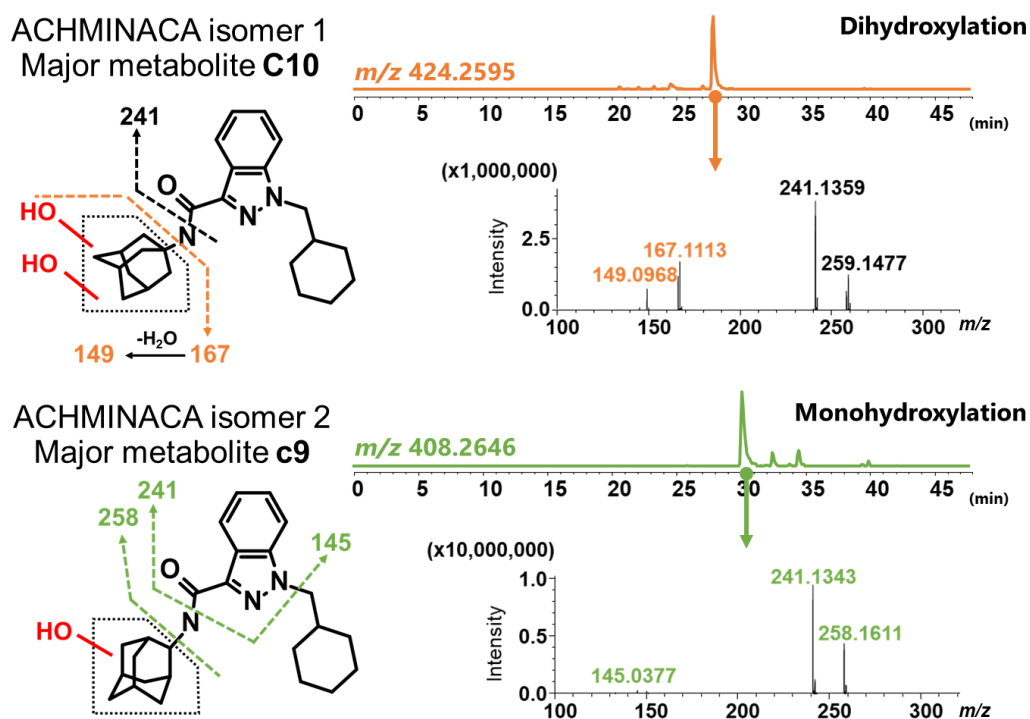


Fig. 7 EICs and MS² spectra for the major metabolites of ACHMINACA isomers

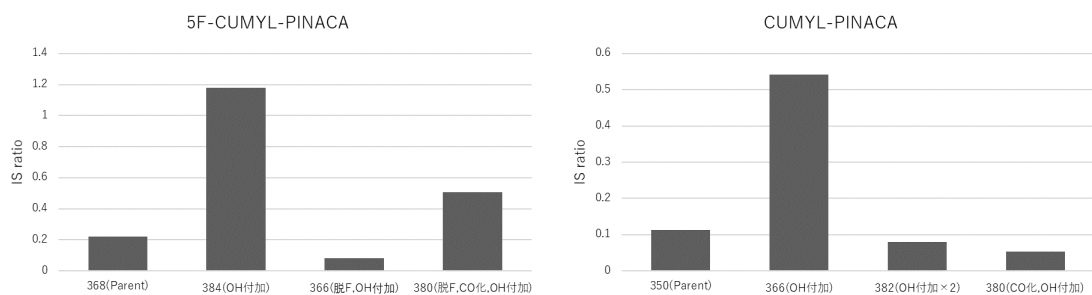


Fig. 8 胆汁中より検出された化合物の割合

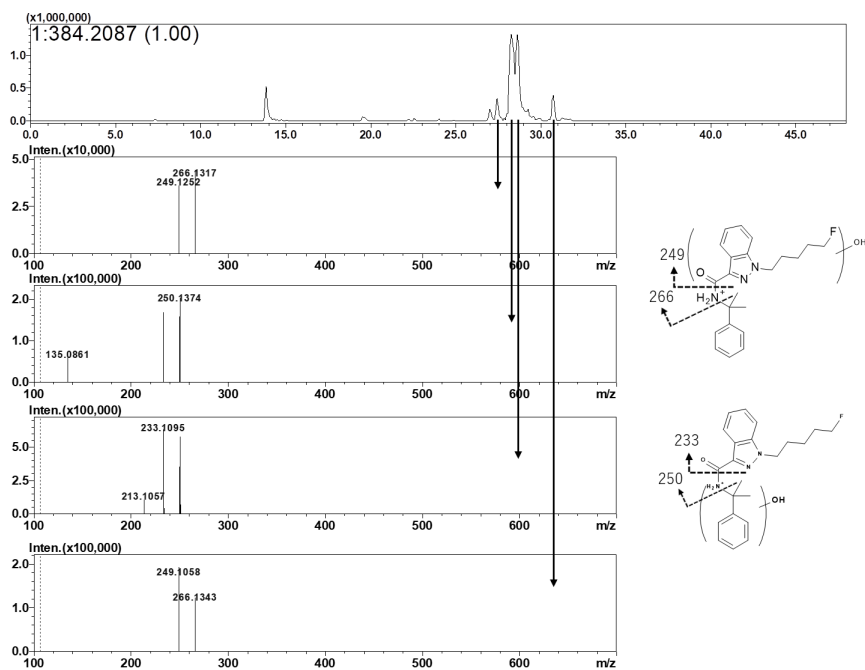


Fig. 9 5F-CUMYL-PINACA の胆汁中主要代謝物

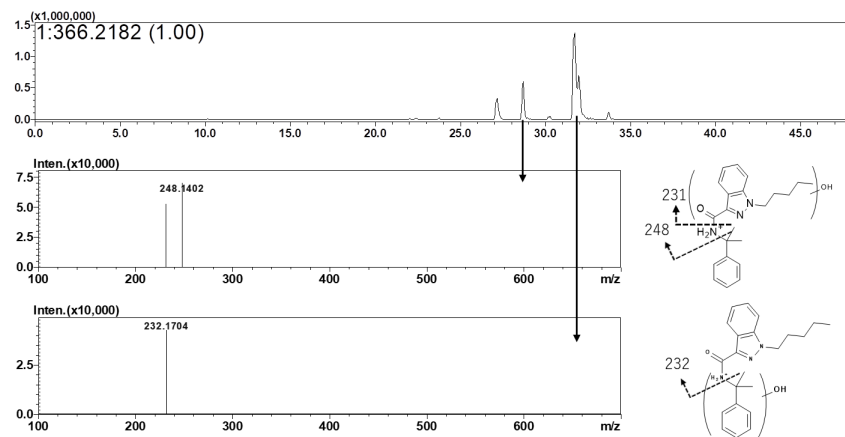


Fig. 10 CUMYL-PINACA の胆汁中主要代謝物

分担研究報告書

新規危険ドラッグの乱用実態把握のための効果的な調査手法の確立

分担研究者：嶋根 卓也（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部）
研究協力者：山田 理沙（国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

【背景】近年、危険ドラッグ使用者が減少する一方で、大麻使用者が増加している。平成 30 年 8 月に策定された第五次薬物乱用防止五か年戦略では、THC などの大麻成分を濃縮・抽出した大麻ワックスや大麻リキッドや、THC を食品に混入した大麻クッキーなど、新たな形状の大麻製品に対する注意が喚起されているが、国内における使用実態は依然として不明である。

【目的】本研究では、レクリエーション・セッティングにおいて、大麻の使用実態を掘り下げることを目的とした。

【方法】対象は、関東地方で開催された音楽関連の野外イベント（野外フェスティバル）に参加した 16 歳以上の来場者であった。計 2 回のイベントで、携帯端末やタブレットを活用したオンライン調査を実施し、計 437 名より有効回答を得た。大麻の使用実態は、生涯経験、過去 1 年の経験、使用回数、使用した大麻の形状、使用目的・動機、併用薬物について尋ねた。

【結果】

1. 大麻の生涯経験率は 12.6%、過去 1 年経験率は 2.5%であった。
2. 使用経験のある大麻の形状は、乾燥大麻（10.5%）、大麻樹脂（4.6%）、大麻クッキーなどの加工品（2.7%）、大麻リキッド（1.4%）、大麻ワックス（1.1%）と続いた。
3. 大麻経験群は、大麻非経験群に比べ、男性の比率が高く（経験群 80.0%、非経験群 44.3%、 $p<0.001$ ）、喫煙率が高く（過去 1 年、過去 30 日、喫煙日数ともに）、それぞれ有意差が認められた。一方、飲酒については、いずれも有意差が認められなかった。
4. 薬物使用の規制に対する考えのうち、「大麻など植物由来のものは規制すべきではない」という考えは、非経験群の 4%のみが選択した一方で、経験群では 40.0%が選択し、有意差が認められた（ $p<0.001$ ）。
5. 北米における大麻合法化に関して、「どのような目的でも賛成」という考えは、非経験群の 6.4%のみが選択した一方で、経験群では 50.9%が選択し、有意差が認められた（ $p<0.001$ ）。
6. 大麻使用の目的・動機は、「効果を楽しみたい」50.0%、「興味があった」41.2%、「モノの感じ方を変えたい」32.4%、「パーティーなどの特別な日に」23.5%、「睡眠の問題を改善したい」20.6%と続いた。
7. 大麻使用時の併用薬物は、アルコールが最も多く（64.7%）、タバコ（55.9%）、覚せい剤（23.5%）、危険ドラッグ（17.6%）、コカイン（17.6%）、MDMA（14.7%）、LSD（14.7%）と続いた。

【考察】本研究では、レクリエーション・セッティングの一つとして音楽関連の野外イベント（野外フェスティバル）をフィールドとした、大麻の使用実態を掘り下げる試みを行った。使用される大麻は、従来の乾燥大麻や大麻樹脂が高頻度で報告された。また、大麻クッキーなどの加工品、電

子タバコで使用される大麻リキッド、高濃度の THC を含有する大麻ワックスなど新たな形状の大麻製品に関する使用経験も確認された。更に、大麻の規制や北米の大麻合法化に対する考えが把握できた。また、大麻使用経験者の間に、大麻使用を肯定する考えが広がっており、海外における嗜好目的あるいは医療目的での大麻使用が認められる動きが、大麻使用行動に影響を与えている可能性が推測された。

A. 研究目的

近年、危険ドラッグの流行が沈静化する一方で、大麻使用者の増加が報告されている。2017年に実施された「薬物使用に関する全国住民調査」によれば、規制薬物のうち、最も高頻度で使用されているのは大麻であり、15歳～64歳までの使用者人口は、全国で約130万人と推計されている。大麻使用者増加の一因として、大麻使用に誘われる機会が増加していることや、大麻使用を肯定する考えが広がっていることが推測される¹⁾。

大麻使用については、使用される大麻の形状が多様化している。例えば、大麻ワックスや大麻リキッドといった THC などの大麻成分を濃縮・抽出した製品や、THC を食品に混入した大麻クッキーなどが該当する。平成30年8月に策定された第五次薬物乱用防止五か年戦略では、こうした大麻の新しい形状に対する注意が喚起されているものの、国内における疫学情報はほとんど存在しない。

そこで本研究では、使用者人口が急増する大麻の使用実態を掘り下げることが目的とした。本研究を通じて、新規危険ドラッグの乱用実態把握のための効果的な調査手法を確立させる。

B. 研究方法

1. 対象者

対象は、関東地方で開催された音楽関連の野外イベント（野外フェスティバル）に参加した16歳以上の来場者である。調査は、2018年9月および2019年9月の2回実施した。なお、調査を実施したイベントの開催場所や内容は異なっている。

2. 調査方法

調査は無記名の自記式調査によって行われた。まず、調査実施にあたり、イベント主催者の了承を得た上で、イベント会場にブースを設営した（プロジェクト名：One Love Online）。次に、事前にトレーニングを受けたスタッフが来場者に対して、薬物乱用・依存の予防啓発および薬物依存症の理解を訴えながらチラシを配布し、アンケートへの参加を呼びかけた。アンケート参加を希望する来場者は、チラシに書かれた QR コードを携帯電話・スマートフォンから読み取り、アンケートサイトに誘導した（図1）。携帯電話を持っていない場合や、QR コードを読み取れない場合は、ブースに設置されたタブレット端末を使って回答した。

回答者へのインセンティブとして、調査終了画面をイベント会場内の出展ブースで提示した回答者には、謝礼品（音楽 CD や野外イベントに関するグッズ）を手渡した。また、ダルクなどの民間支援団体に関するパンフレットや、依存症の理解を促進するための啓発資料も併せて配布した。

本研究では、イベント会場内（あるいは店舗）で調査実施の案内チラシを受け取った来場者が、自由意思に基づき調査システムにアクセスするという「応募法」を採用しており、「案内チラシを受け取らない」、「チラシを受け取ったとしても自ら調査システムにアクセスしない」という形で拒否機会が担保されている。また、「アンケートへの回答は任意であること」、「回答途中でも回答をやめることができること」を調査画面に明記することで、「拒否機会の担保」をより確実にした。

なお、研究実施にあたり、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得た

(承認番号 A2015-025)。

3. インターネット・セキュリティ

本研究におけるオンライン調査のシステム開発は、株式会社マイ・ビジネスサービス（以下、MBS）に委託した。MBS は、以下の手順でインターネット上のセキュリティを確保した。本研究で用いる web 上の調査システムは、Hypertext Transfer Protocol (HTTP) を Secure Socket Layer (SSL) で保護することによって、研究対象者が回答したデータを暗号化してサーバーに送信し、情報漏洩防止策とした。サイトの構築、収集データの際には、File Transfer Protocol (FTP) での接続を許可し、主に SSL で保護された FTP over SSL (FTPS) で暗号化してサーバーに接続を行った。ただし、開発元でも管理者 ID を発行して ID 保持者のみがサーバーへアクセス可能なように制限した。インターネットとサーバーの間にサービス提供内のプロトコル以外で不正なパケットの転送がないよう Firewall で適切なブロックを行った。

研究に用いるサーバーは、MBS が外部サーバー会社と契約している OEM サーバーを使用した。このサーバーは、Redundant Array of Inexpensive Disks (RAID) 機能を有しており、不測の事態によりサーバーのディスクが停止した場合も代替ディスクによりシステムが正常に稼動するように配慮した。なお、サーバーが設置されている建物へのアクセスは厳重な入室管理チェックによってセキュリティが保たれていた。消火設備にはハロゲン消火装置が設置され、その他にも、EIA 規格の 19 インチラックの使用、電源系統の多重化、センター内のバッテリー、非常用発電機設備、精密な空調管理と耐震設備により安全な運用を行った。サーバーの稼動状況を監視するため、専用の監視サーバーを構築した。また、死活監視及びサービス監視を行い、サーバー監視により機器異常を検知した場合は、外部サーバー会社から MBS に速やかに警告メールが送信される体制とした。

同一対象者による重複回答を防止するために、Cookie 機能を用いて、ブラウザの Cookie 情報にユニーク ID と各設問の回答状況を保持することにより、同一端末の同一ブラウザによる回答は、調査期間中 1 回のみ可能とした。また、次のページへ遷移するたびにユニーク ID をアンケートシステム側がチェックすることによって、アンケートの最初のページへ 1 回もアクセスしていない場合に、途中ページへ直接アクセスすることを防止した。

4. 調査項目・統計解析

大麻の使用実態は、生涯経験、過去 1 年経験、大麻の使用回数（1 回だけ、数回、数えきれない）、使用した大麻の形状（乾燥大麻、大麻樹脂、大麻ワックス、大麻リキッド、大麻クッキーなどの加工品）、使用目的・動機（12 項目）、併用薬物（10 種類）について尋ねた。

大麻の使用目的・動機は、Comprehensive Marijuana Motives Questionnaire²⁾ をもとに作成した。原文では大麻使用に対する動機について因子分析を用いて 12 因子（各因子 3 項目から構成される）が抽出されている。ここでいう抽出因子とは、Enjoyment, Conformity, Coping, Experimentation, Boredom, Alcohol, Celebration, Altered Perceptions, Social Anxiety, Relative Low Risk, Sleep, Availability の 12 因子である。各因子より、因子負荷量の最も高い項目、または我が国の薬物使用における状況や環境に適した項目を 1 項目選択し、和訳した（2019 年調査から採用）。

併用薬物については、併用薬物については、タバコやアルコールとの同時使用が諸外国で報告^{3,4)}されていることから、「大麻を使う際、一緒に（同時に）使ったことがある薬物」を尋ね、タバコ、アルコール、危険ドラッグ、吸入剤、覚せい剤、MDMA、LSD、コカイン、ヘロイン、その他の 10 種類から当てはまる薬物すべてを選択する方法をとった（2019 年調査から採用）。

また、大麻使用関連項目として、CBD（大麻草から抽出されるオイルや粉末）製品の使

用経験について尋ねた。また、カナダやアメリカの一部の州における大麻の合法化政策に対する考えについても尋ねた。選択肢は、「どのような目的でも反対」、「医療目的は賛成だが、嗜好目的は反対」、「医療目的は反対だが、嗜好目的は賛成」、「どのような目的でも賛成」、「いずれも当てはまらない」の5項目であり、この中から1つを選択する形式をとった。

その他、年齢や性別などの基本属性、飲酒、喫煙、エナジードリンクの使用状況、依存症に関する知識等について尋ねた。

飲酒については、過去1年間、過去30日間の飲酒経験とともに、Binge Drinking 経験および過去30日以内の経験日数を尋ねた。Binge Drinking (ビンジドリンキング) とは、米国の薬物乱用・精神衛生管理庁 (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) によれば、一回の飲酒機会 (例えば、2時間くらいの飲み会で)、多くのお酒 (男性の場合は5杯以上、女性の場合は、4杯以上) を飲むことと定義されており、この定義を採用した。

喫煙については、過去1年間の喫煙経験、過去30日間の喫煙経験および喫煙日数を尋ねた。また、過去1年間に使用したタバコの種類 (紙巻たばこ、加熱式タバコ、電子タバコ、葉巻、その他) を、選択肢より当てはまるものすべてを選ぶ方式で尋ねた。

統計解析は、まず、調査年ごとの対象者の特徴を把握するために2018年調査群 (n=130) および、2019年調査群 (n=307) について、群間比較を行った (表1~3)。次に2018~2019年のデータを統合した上で、大麻使用経験の有無に基づき、対象者を大麻経験群 (n=55) と大麻非経験群 (n=382) に分類し、群間比較を行った (表4~6)。2019年の大麻使用経験者 (n=34) について、大麻の使用目的・動機、大麻使用時の併用薬物について尋ねた (表7)。

なお、群間の有意差検定は、量的変数についてはt検定を、カテゴリカル変数についてはピアソンのカイ二乗検定を用いた。

C. 研究結果

1. 2018年および2019年調査の比較

表1~3に、2018年および2019年調査の比較結果を示した。

2018年調査群は、2019年調査群に比べて、過去1年以内の飲酒経験率が高く (2019年76.5%、2018年87.7%、 $p=0.008$)、過去30日以内の飲酒日数も多く、ビンジドリンキングの経験率 (2019年39.4%、2018年51.5%、 $p=0.019$) および日数も多く、それぞれ有意差が認められた。喫煙経験については、いずれの項目についても群間に有意差は認められなかった。性別および平均年齢についても、群間に有意差が認められなかった (表1)。

薬物使用行動についても、多くの項目では群間に有意差が認められなかったが、有機溶剤の生涯経験率 (2019年4.6%、2018年0.8%、 $p=0.047$) および大麻の過去1年経験率 (2019年1.3%、2018年5.4%、 $p=0.013$) については、群間に有意差が認められた (表2)。

薬物使用に対する考えについては、「大麻など植物由来のものは規制すべきではない」という回答が2018年調査群で有意に高かった (2019年6.5%、2018年13.1%、 $p=0.024$)。北米における大麻合法化に関する考えについては、「どのような目的でも賛成」という回答が2018年調査群において有意に高かった (2019年9.1%、2018年18.0%、 $p=0.009$) (表3)。

2. 大麻の使用実態について

ここでは、2018年~2019年調査のデータを統合した対象者全体の結果を示した。

大麻の生涯経験率は12.6%、過去1年経験率は2.5%であった。これまでの大麻の使用回数は、数回 (5.5%)、数え切れない (4.8%)、1回だけ (2.3%) と続いた。使用経験のある大麻の形状は、乾燥大麻 (10.5%)、大麻樹脂 (4.6%)、大麻クッキーなどの加工品 (2.7%)、大麻リキッド (1.4%)、大麻ワックス (1.1%) と続いた。CBD製品の使用率は5.7%であっ

た (表 2)。

薬物使用の規制に対する考えのうち、「大麻など植物由来のものであっても規制すべき」という回答が 13.3%であったのに対して、「大麻など植物由来のものは規制すべきではない」は 8.5%であった。北米における大麻合法化に関する考えとしては、「医療目的は賛成だが、嗜好目的は反対」という回答が 47.2%と最も多く、「どのような目的でも反対」が 29.7%、「どのような目的でも賛成」が 11.6%であった (表 3)。

3. 大麻使用経験の有無の比較

表 4~6 に、大麻経験群と大麻非経験群との群間比較の結果を示した。大麻経験群は、大麻非経験群に比べ、男性の比率が高く (経験群 80.0%、非経験群 44.3%、 $p<0.001$)、喫煙率が高く (過去 1 年、過去 30 日、喫煙日数ともに)、それぞれ有意差が認められた。一方、飲酒については、いずれも有意差が認められなかった (表 4)。

大麻経験群における他の薬物の生涯経験率は、大麻非経験群に比べて有意に高く、覚せい剤 32.7%、危険ドラッグ 21.8%、吸入剤 21.8%、MDMA 21.8%、LSD 20.0%、コカイン 20.0%、ヘロイン 7.3%と続いた (表 5)。

薬物使用の規制に対する考えのうち、「大麻など植物由来のものは規制すべきではない」という考えは、非経験群の 4%のみが選択した一方で、経験群では 40.0%が選択し、有意差が認められた ($p<0.001$)。

北米における大麻合法化に関して、「どのような目的でも賛成」という考えは、非経験群の 6.4%のみが選択した一方で、経験群では 50.9%が選択し、有意差が認められた ($p<0.001$)。

4. 大麻使用の目的・動機および併用薬物

大麻使用の目的・動機は、「効果を楽しみたい」が 50.0%と最も多く、「興味があった」41.2%、「モノの感じ方を変えたい」32.4%、「パーティーなどの特別な日に」23.5%、「睡眠の

問題を改善したい」20.6%、「手に入りやすい」17.6%、「大麻仲間からのプレッシャー」14.7%、「暇だった」14.7%、「身体への悪影響が少ないから」14.7%、「いやなことを忘れたい」11.8%、「不安な気持ちを和らげたい」8.8%、「酔った勢い」5.9%と続いた (表 7)。

大麻使用時の併用薬物は、アルコールが最も多く (64.7%)、タバコ (55.9%)、覚せい剤 (23.5%)、危険ドラッグ (17.6%)、コカイン (17.6%)、MDMA (14.7%)、LSD (14.7%)、吸入剤 (5.9%)、ヘロイン (5.9%) と続いた (表 7)。

D. 考 察

本研究では、使用者人口が急増している大麻の使用実態を掘り下げることが目的として、音楽関連の野外イベント (野外フェスティバル) の来場者を対象として調査を実施した。野外フェスティバルは、いわゆる「レクリエーション・セッティング」であり、薬物使用リスクが高いフィールドの一つとして知られている^{5,6)}。国内では、ナイトクラブ来場者を対象とした MDMA 研究⁷⁾や、野外フェスティバル来場者を対象とする危険ドラッグ研究⁸⁾が報告されているのみである。

2018 年および 2019 年の調査対象を比較したところ、年齢や性別には違いがみられなかったものの、飲酒率や一部の薬物使用率で有意差が認められた。本研究における実態調査は、異なる場所で実施された、異なる内容の野外イベントで実施されたものであるため、来場者の属性に多少のバラツキが生じるのは当然の結果である。本研究では、応募法によりリクルートされた者が対象となっているため、対象者の代表性を論じることはいできない。そもそも、代表的な野外フェスティバルの来場者を定義すること自体が困難であると考えらるべきであろう。本研究の結果を解釈する前提として、本研究の対象者が有意抽出によって集められた集団であることを考慮に入れる必要がある。一般人口に比べて、大麻使用者

が高頻度に存在する集団を捕捉していることが、本研究の利点である。なぜなら、より効率的に、かつ短期間で大麻の使用実態を掘り下げることができるからである。本研究の対象者における大麻の生涯経験率は 12.6%であり、これは一般住民調査における 1.4%を大きく上回っている。

使用される大麻の形状は、従来の乾燥大麻や大麻樹脂が高頻度で報告された。また、大麻クッキーなどの加工品、電子タバコで使用される大麻リキッド、高濃度の THC を含有する大麻ワックスなど新たな形状の大麻製品に関する使用経験も確認された。

一般人口において大麻使用者が増加する背景の一つとして、大麻使用を肯定する考えが広がっていることが指摘されているが¹⁾、本研究においても、大麻使用経験群の 40%が「大麻などの植物由来のものは規制すべきではない」と考えていることに加え、北米の大麻合法化に対して「どのような目的でも賛成」と回答が約 50%であった。これらは、大麻使用者の間で、大麻使用を肯定する考えが広がっていることを示唆する結果といえる。海外における嗜好目的あるいは医療目的での大麻使用が認められる動きが、日本国内の大麻使用に影響を与えている可能性が考えられた。

今回の調査より、大麻使用の目的・動機を掘り下げるために、Comprehensive Marijuana Motives Questionnaire による測定を試みた。本研究においては、「効果を楽しみたい」、「興味があった」などの項目が高頻度で選択されている一方、「不安な気持ちを和らげたい」、「酔った勢い」などの項目は低頻度であった。Comprehensive Marijuana Motives Questionnaire は、12 の下位因子で構成されており、「効果を楽しみたい」は”Enjoyment (楽しみ)”、「興味があった」は”Experimentation (実験)”という下位因子に該当する。その一方で、「不安な気持ちを和らげたい」は”Social anxiety (社会不安)”、「酔った勢い」は”Alcohol (飲酒)”という下位因子に該当する。大麻使用を予測した多変量解析によれば、Enjoyment、

Experimentation の回帰係数は、他の因子の回帰係数に比べて大きく、Social anxiety、Alcohol の回帰係数は、他の因子の回帰係数に比べて小さいことが報告されている²⁾。本研究における結果はこれらの文献と一致しており、大麻使用の目的・動機についての妥当性が高いと解釈することができる。

一方、大麻使用の目的・動機として「酔った勢い」を選択される回答が少ないにも関わらず、最も高頻度で大麻と併用される物質が「アルコール」という結果が得られた。これは一見、矛盾する結果のように感じられるが、野外フェスティバルのようなレクリエーション・セッティングでは、ビールなどの酒類が販売されていることが多い。本研究では、大麻を使用した場所を特定する項目がないことが方法論上の限界となっているが、野外フェスティバルなどのレクリエーション・セッティングにおいて大麻が使用されることが多いと仮定するならば、最も併用される薬物が「アルコール」となるのは、自然な結果といえよう。とはいえ、飲酒によって酩酊状態になることが必ずしも大麻使用を促進しているわけではない点は興味深い。飲酒と大麻使用との関係性については、大麻を使用している場所も含めて、今後の研究において検証を進める必要がある。

E. 結 論

本研究では、レクリエーション・セッティングの一つとして音楽関連の野外イベント（野外フェスティバル）をフィールドとし、大麻の使用実態を掘り下げる試みを行った。使用される大麻は、従来の乾燥大麻や大麻樹脂が高頻度で報告され、大麻クッキーなどの加工品、電子タバコで使用される大麻リキッド、高濃度の THC を含有する大麻ワックスなど、新たな形状の大麻製品に関する使用経験も確認された。また、大麻の規制や北米の大麻合法化に対する考えについて把握することができた。大麻使用者の間に、大麻使用を

肯定する考えが広がっており、海外における嗜好目的あるいは医療目的での大麻使用が認められる動きが、大麻使用行動に影響を与えている可能性が推測された。

F. 参考文献

1. 嶋根卓也, 邱冬梅, 和田清: 薬物使用に関する全国住民調査 (2017年). 平成29年度厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業「薬物乱用・依存状況等のモニタリング調査と薬物依存症者・家族に対する回復支援に関する研究」分担研究報告書, pp7-148, 2018.
2. Lee CM, Neighbors C, Hendershot CS, Grossbard JR. Development and preliminary validation of a comprehensive marijuana motives questionnaire. *J Stud Alcohol Drugs*. 2009;70(2):279-287.
3. Patrick, M.E., Fairlie, A.M., Lee, C.M., 2018. Motives for simultaneous alcohol and marijuana use among young adults. *Addict Behav*. 2018 Jan; 76:363-369.
4. Martin, C.S., Clifford, P.R., Clapper, R.L., 1992. Patterns and predictors of simultaneous and concurrent use of alcohol, tobacco, marijuana, and hallucinogens in first year college students. *J. Subst. Abuse* 4, 319-326.
5. Van Havere, T., Van der plasschen, W., Broekaert, E. and De Bourdeaudhui, I.: The Influence of Age and Gender on Party Drug Use Among Young Adults Attending Dance Events, Clubs, and Rock Festivals in Belgium. *Substance Use & Misuse*., 44(13): 1899-1915, 2009.
6. Lim, M.S., Hellard, M.E., Hocking, J.S., Spelman, T.D. and Aitken, C.K.: Surveillance of drug use among young people attending a music festival in Australia, 2005-2008. *Drug Alcohol Rev.*, 29(2):150-6,

2010.

7. Shimane, T., Hidaka, Y., Wada, K. and Funada, M.: Ecstasy (3, 4-methylenedioxymeth-amphetamine) use among Japanese rave population. *Psychiatry Clin Neurosci.*, 67(1):12-19, 2013.
8. 山田理沙, 嶋根卓也, 船田正彦: レクリエーション・セッティングにおける危険ドラッグ使用パターン of 男女別検討、日本アルコール・薬物医学会雑誌 54(6),2020 (印刷中)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 嶋根卓也, 高橋哲, 竹下賀子, 小林美智子, 高岸百合子, 大宮宗一郎, 近藤あゆみ, 高野洋一, 山木麻由子, 松本俊彦: 覚せい剤事犯者における薬物依存の重症度と再犯との関連性: 刑事施設への入所回数から見た再犯、日本アルコール・薬物医学会雑誌 54(5),211-221, 2019.
2. 嶋根卓也, 邱冬梅, 和田清: 日本における大麻使用の現状: 薬物使用に関する全国住民調査2017より, *YAKUGAKU ZASSHI*, 140(2),173-178, 2020.
3. 嶋根卓也: 過量服薬に対する薬剤師の役割. *臨床精神薬理* 22(3), 293-299, 2019.
4. 嶋根卓也, 猪浦智史: わが国における大麻使用の動向-全国規模の疫学調査の結果から、医学のあゆみ 271(11),1187-1191, 2019.
5. 嶋根卓也: 国内外における大麻使用経験率-疫学調査から-, *精神科治療学* 35(1),5-12, 2020.
6. 嶋根卓也: 「NO」と言えない子どもたち-酒・タバコ・クスリと援助希求。「助けて」が言えない SOSを出さない人に支援者は何ができるか (松本俊彦編), 日本評論社, pp92-101, 2019.
7. 嶋根卓也: 第8章 性的マイノリティ・

- HIV 感染者の理解と支援. 物質使用障害の治療 多様なニーズに応える治療回復支援 (松本俊彦編著), 金剛出版, 東京, pp141-155, 2020.
8. 山田理沙, 嶋根卓也, 船田正彦: レクリエーション・セッティングにおける危険ドラッグ使用パターンの男女別検討、日本アルコール・薬物医学会雑誌 54(6),2020 (印刷中)
 9. 谷真如、高野洋一、高宮英輔、嶋根卓也: 覚せい剤取締法違反により刑事施設に入所した刑の一部執行猶予者の心理・社会的特徴、Jap.J.Crim.Psychol, 57(2), 1-17, 2020.
2. 学会発表
1. Shimane T: Increase Cannabis Users in Japan: Findings from nationwide general population survey on drug use in 2017. 2019 Expert meeting on the indicator, prevalence and patterns of drug use, EMCDDA, Lisbon, Portugal, 2019.5.28-29.
 2. Shimane T: Misuse of medicines among patients with substance use disorders in Japan: findings from Nationwide Mental Hospital Survey. Problem Drug Use (PDU) 2019 Expert meeting, EMCDDA, Lisbon, Portugal, 2019.5.27-28.
 3. Shimane T, Tachimori H, Qiu D, Wada K : Increase cannabis users in Japan: findings from nationwide general population survey on drug use 2017. 11th Thailand Substance Abuse Conference. International Influence on Drug Abuse, Bangkok, Thailand, 2019.8.7-9.
 4. Shimane T: Drug policy and epidemiology of drug use in Japan: results from nationwide surveys, Taiwan and Japan friendship seminar on Substance use and HIV/AIDS treatment, Tokyo, Japan,2019.10.29.
 5. Inoura S, Shimane T, Kitagaki K, Tachimori H, Qiu D, Wada K : Changing Trends in Substance Use among Japanese Adolescents from Nationwide Junior High School Survey. 11th Thailand Substance Abuse Conference. International Influence on Drug Abuse, Bangkok, Thailand, 2019.8.7-9.
 6. 嶋根卓也: 中毒診療における薬剤師の役割. シンポジウム 4 多職種関連シンポジウム～多職種で挑む中毒診療の「わ」～. 第 41 回日本中毒学会総会・学術集会, 埼玉, 2019.7.21.
 7. 嶋根卓也: 覚せい剤事犯者の入所度数と薬物依存との関連. シンポジウム 9 覚せい剤事犯者の理解とサポート. 第 54 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 北海道, 2019.10.5.
 8. 嶋根卓也: 薬物使用と生活に関する全国高校生調査 2018. シンポジウム 18 依存症の実態調査: 依存症対策全国センター平成 30 年度成果報告, 第 54 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 北海道, 2019.10.6.
 9. 嶋根卓也: 学校薬剤師による「ダメ、ゼッタイ」で終わらせない薬物乱用防止教室. 第 52 回日本薬剤師会学術大会 分科会 19「薬物乱用防止教室の原点にかえる」, 山口, 2019.10.14.
 10. 船田正彦, 嶋根卓也, 富山健一, 三島健一: 日本における大麻使用の現状: 薬物使用に関する全国住民調査 2017 より. 一般シンポジウム S58 薬物乱用のトレンド: ポスト危険ドラッグとして的大麻問題を考える. 日本薬学会第 139 年会, 千葉, 2019.3.23.
 11. 山田理沙, 嶋根卓也, 船田正彦: レクリエーション・セッティングにおける危険ドラッグ使用の実態調査. 2019 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 北海道, 2019.10.5.
 12. 引土絵未, 岡崎重人, 加藤隆, 山本大, 山崎明義, 松本俊彦, 嶋根卓也: 民間回復支援施設における治療共同体 エンカウンター・グループの効果について. 2019 年度アルコール・薬物依存関連学会合同

学術総会，北海道，2019.10.5.

13. 猪浦智史，嶋根卓也，北垣邦彦，和田清，松本俊彦：全国の高校生における両親の飲酒頻度と生徒の暴飲の関連について．2019年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，北海道，2019.10.5.
14. 喜多村真紀，嶋根卓也，小林美智子，近藤あゆみ，伴恵理子，大宮宗一郎，高岸百合子，松本俊彦：覚せい剤の早期使用と小児期逆境体験との関連：全国の刑務所における「薬物事犯者に関する研究」より．2019年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，北海道，2019.10.5
15. 近藤あゆみ，嶋根卓也，高橋哲，竹下賀子，小林美智子，高岸百合子，大宮宗一郎，高野洋一，山木麻由子，松本俊彦：全国刑事施設からみた覚せい剤事犯者の性差．国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 令和元年度 研究報告会，東京，2020.3.2.
16. 猪浦智史，嶋根卓也，北垣邦彦，和田清，松本俊彦：全国の高校生における親の飲酒習慣と生徒の暴飲との関連．国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 令和元年度 研究報告会，東京，2020.3.2.

K. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし。

表1. 調査年別にみた対象者の基本属性および飲酒・喫煙経験

	調査年			p-value	
	2019年		2018年		合計
	n (%)	n (%)	n (%)		n=437
平均年齢	39.1 (12.5)	41.3 (13.6)	39.7 (12.9)	0.113	
性別				0.136	
男性	138 (45.0)	72 (55.4)	210 (48.1)		
女性	166 (54.1)	57 (43.8)	223 (51.0)		
その他	3 (1.0)	1 (0.8)	4 (0.9)		
飲酒経験 (過去1年)				0.008	
あり	235 (76.5)	114 (87.7)	349 (79.9)		
飲酒経験 (過去30日)				0.066	
あり	199 (64.8)	96 (73.8)	295 (67.5)		
飲酒日数 (過去30日)				0.009	
0日	108 (35.2)	34 (26.2)	142 (32.5)		
1~2日	63 (20.5)	22 (16.9)	85 (19.5)		
3~5日	31 (10.1)	15 (11.5)	46 (10.5)		
6~9日	21 (6.8)	18 (13.8)	39 (8.9)		
10~19日	28 (9.1)	21 (16.2)	49 (11.2)		
20~29日	29 (9.4)	16 (12.3)	45 (10.3)		
毎日	27 (8.8)	4 (3.1)	31 (7.1)		
ビンジドリンキング (過去30日)				0.019	
あり	121 (39.4)	67 (51.5)	188 (43.0)		
ビンジドリンキング (過去30日)				0.018	
0日	184 (59.9)	63 (48.5)	247 (56.5)		
1~2日	69 (22.5)	37 (28.5)	106 (24.3)		
3~5日	18 (5.9)	18 (13.8)	36 (8.2)		
6~9日	11 (3.6)	5 (3.8)	16 (3.7)		
10~19日	8 (2.6)	6 (4.6)	14 (3.2)		
20~29日	5 (1.6)	0 (0.0)	5 (1.1)		
毎日	10 (3.3)	1 (0.8)	11 (2.5)		
喫煙経験 (過去1年)				0.596	
あり	84 (27.4)	31 (23.8)	115 (26.3)		
喫煙経験 (過去30日)				0.536	
あり	77 (25.1)	29 (22.3)	106 (24.3)		
喫煙日数 (過去30日)				0.200	
0日	228 (74.3)	101 (77.7)	329 (75.3)		
1~2日	2 (0.7)	3 (2.3)	5 (1.1)		
3~5日	2 (0.7)	1 (0.8)	3 (0.7)		
6~9日	1 (0.3)	2 (1.5)	3 (0.7)		
10~19日	2 (0.7)	3 (2.3)	5 (1.1)		
20~29日	4 (1.3)	1 (0.8)	5 (1.1)		
毎日	66 (21.5)	19 (14.6)	85 (19.5)		
使用したタバコ種別 (過去1年)					
いずれもなし	224 (73.0)	99 (76.2)	323 (73.9)	0.488	
紙巻きタバコ	50 (16.3)	25 (19.2)	75 (17.2)	0.456	
加熱式タバコ	36 (11.7)	11 (8.5)	47 (10.8)	0.314	
電子タバコ	5 (1.6)	2 (1.5)	7 (1.6)	0.945	
葉巻	3 (1.0)	0 (0.0)	3 (0.7)	0.258	
その他	2 (0.7)	2 (1.5)	4 (0.9)	0.373	

表2. 調査年別にみた対象者の薬物使用行動

	調査年		合計 n=437 n (%)	p-value
	2019年 n=307 n (%)	2018年 n=130 n (%)		
	薬物使用 (生涯)			
大麻	34 (11.1)	21 (16.2)	55 (12.6)	0.143
危険ドラッグ	12 (3.9)	5 (3.8)	17 (3.9)	0.975
有機溶剤	14 (4.6)	1 (0.8)	15 (3.4)	0.047
覚せい剤	17 (5.5)	4 (3.1)	21 (4.8)	0.272
MDMA	9 (2.9)	4 (3.1)	13 (3.0)	0.935
LSD	7 (2.3)	4 (3.1)	11 (2.5)	0.627
コカイン	9 (2.9)	2 (1.5)	11 (2.5)	0.395
ヘロイン	3 (1.0)	1 (0.8)	4 (0.9)	0.835
その他	9 (2.9)	1 (0.8)	10 (2.3)	0.167
薬物使用 (過去1年)				
大麻	4 (1.3)	7 (5.4)	11 (2.5)	0.013
危険ドラッグ	3 (1.0)	2 (1.5)	5 (1.1)	0.614
有機溶剤	1 (0.3)	1 (0.8)	2 (0.5)	0.530
覚せい剤	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.5)	0.356
MDMA	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (0.2)	0.124
LSD	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (0.2)	0.124
コカイン	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
ヘロイン	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
その他	2 (0.7)	1 (0.8)	3 (0.7)	0.892
大麻使用回数	0.539			
一度もない	273 (88.9)	109 (83.8)	382 (87.4)	
1回だけ	6 (2.0)	4 (3.1)	10 (2.3)	
数回	15 (4.9)	9 (6.9)	24 (5.5)	
数えきれないくらい	13 (4.2)	8 (6.2)	21 (4.8)	
CBD製品 (大麻草から抽出されるオイルや粉末)の使用経験	0.121			
あり	21 (6.8)	4 (3.1)	25 (5.7)	
使用した大麻形状				
乾燥大麻	28 (9.1)	18 (13.8)	46 (10.5)	0.141
大麻樹脂 (チョコ)	11 (3.6)	9 (6.9)	20 (4.6)	0.127
大麻ワックス	3 (1.0)	2 (1.5)	5 (1.1)	0.614
大麻リキッド (電子タバコ)	3 (1.0)	3 (2.3)	6 (1.4)	0.275
大麻クッキーなどの加工品	8 (2.6)	4 (3.1)	12 (2.7)	0.783
その他	3 (1.0)	2 (1.5)	5 (1.1)	0.614

表3. 調査年別にみた対象者の薬物使用に関する意識・考え

	調査年		合計 n=437 n (%)	p-value
	2019年 n=307 n (%)	2018年 n=130 n (%)		
	薬物使用の規制に対する考え			
違法・合法に関わらず薬物は規制すべき	193 (62.9)	73 (56.2)	266 (60.9)	0.189
合法的なものは個人の判断に任せるべき	78 (25.4)	32 (24.6)	110 (25.2)	0.862
違法・合法に関わらず個人の判断に任せるべき	12 (3.9)	4 (3.1)	16 (3.7)	0.672
大麻など植物由来のものは規制すべきではない	20 (6.5)	17 (13.1)	37 (8.5)	0.024
大麻など植物由来のものであっても規制すべき	37 (12.1)	21 (16.2)	58 (13.3)	0.248
薬物に対する日本の取り締まりは厳しすぎる	17 (5.5)	9 (6.9)	26 (5.9)	0.576
薬物に対する日本の取り締まりは甘すぎる	47 (15.3)	27 (20.8)	74 (16.9)	0.164
いずれも当てはまらない	15 (4.9)	11 (8.5)	26 (5.9)	0.149
北米における大麻合法化に関する考え				
どのような目的でも反対	110 (32.2)	31 (23.3)	141 (29.7)	0.009
医療目的は賛成だが、嗜好目的は反対	166 (48.5)	58 (43.6)	224 (47.2)	
医療目的は反対だが、嗜好目的は賛成	0 (0.0)	1 (0.8)	1 (0.2)	
どのような目的でも賛成	31 (9.1)	24 (18.0)	55 (11.6)	
いずれも当てはまらない わからない	33 (9.6)	16 (12.0)	49 (10.3)	
ギャンブル依存の周知				
知っている	282 (91.9)	116 (89.2)	398 (91.1)	0.379
知らない	25 (8.1)	14 (10.8)	39 (8.9)	
インターネット・ゲーム障害の周知				
知っている	272 (88.6)	116 (89.2)	388 (88.8)	0.848
知らない	35 (11.4)	14 (10.8)	49 (11.2)	
周知している支援団体				
依存症専門病院	126 (41.0)	41 (31.5)	167 (38.2)	0.062
精神保健福祉センター	54 (17.6)	23 (17.7)	77 (17.6)	0.979
回復支援施設 (ダルクなど)	123 (40.1)	36 (27.7)	159 (36.4)	0.014
自助グループ (NA, AA など)	18 (5.9)	8 (6.2)	26 (5.9)	0.907
いずれも知らない	119 (38.8)	68 (52.3)	187 (42.8)	0.009
依存症の支援を必要としている人の存在				
いる	46 (15.0)	10 (7.7)	56 (12.8)	0.037
いない	261 (85.0)	120 (92.3)	381 (87.2)	

表4. 大麻使用別にみた対象者の飲酒・喫煙

	大麻使用				p-value
	経験群		非経験群		
	n	(%)	n	(%)	
平均年齢	41.4	(8.7)	39.5	(13.3)	0.305
性別					<0.001
女性	10	(18.2)	231	(55.0)	
男性	44	(80.0)	186	(44.3)	
飲酒経験 (過去1年)					0.367
あり	38	(69.1)	314	(74.8)	
飲酒経験 (過去30日)				(62.9)	0.706
あり	33	(60.0)	263	(62.6)	
飲酒日数 (過去30日)					0.060
0日	22	(40.0)	157	(37.4)	
1~2日	3	(5.5)	83	(19.8)	
3~5日	5	(9.1)	41	(9.8)	
6~9日	6	(10.9)	33	(7.9)	
10~19日	4	(7.3)	45	(10.7)	
20~29日	8	(14.5)	37	(8.8)	
毎日	7	(12.7)	24	(5.7)	
ビンジ・ドリンク (過去30日)					0.361
あり	25	(45.5)	164	(39.0)	
ビンジ・ドリンク (過去30日)					0.692
0日	30	(54.5)	254	(60.5)	
1~2日	11	(20.0)	96	(22.9)	
3~5日	6	(10.9)	30	(7.1)	
6~9日	2	(3.6)	14	(3.3)	
10~19日	2	(3.6)	12	(2.9)	
20~29日	1	(1.8)	4	(1.0)	
毎日	3	(5.5)	8	(1.9)	
喫煙経験 (過去1年)					<0.001
あり	35	(63.6)	81	(19.3)	
喫煙経験 (過去30日)					<0.001
あり	33	(60.0)	73	(17.4)	
喫煙日数 (過去30日)					<0.001
0日	22	(40.0)	345	(82.1)	
1~2日	2	(3.6)	3	(0.7)	
3~5日	0	(0.0)	3	(0.7)	
6~9日	1	(1.8)	2	(0.5)	
10~19日	3	(5.5)	2	(0.5)	
20~29日	2	(3.6)	3	(0.7)	
毎日	25	(45.5)	60	(14.3)	
使用したタバコ種別 (過去1年)					
いずれもなし	20	(36.4)	341	(81.2)	<0.001
紙巻きタバコ	26	(47.3)	49	(11.7)	<0.001
加熱式タバコ	14	(25.5)	33	(7.9)	<0.001
電子タバコ	3	(5.5)	4	(1.0)	0.009
葉巻	1	(1.8)	2	(0.5)	0.237
その他	2	(3.6)	2	(0.5)	0.016

表5. 大麻使用別にみた対象者の薬物使用

	大麻使用		p-value
	経験群	非経験群	
	n=55 n (%)	n=382 n (%)	
薬物使用 (生涯)			
危険ドラッグ	12 (21.8)	5 (1.2)	<0.001
吸入剤	12 (21.8)	3 (0.7)	<0.001
覚せい剤	18 (32.7)	3 (0.7)	<0.001
MDMA	12 (21.8)	1 (0.2)	<0.001
LSD	11 (20.0)	0 (0.0)	<0.001
コカイン	11 (20.0)	0 (0.0)	<0.001
ヘロイン	4 (7.3)	0 (0.0)	<0.001
その他	9 (16.4)	1 (0.2)	<0.001
薬物使用 (過去1年)			
危険ドラッグ	3 (5.5)	2 (0.5)	<0.001
有機溶剤	1 (1.8)	1 (0.2)	0.089
覚せい剤	1 (1.8)	1 (0.2)	0.089
MDMA	1 (1.8)	0 (0.0)	0.006
LSD	1 (1.8)	0 (0.0)	0.006
その他	3 (5.5)	0 (0.0)	<0.001
CBD製品 (大麻草から抽出されるオイルや粉末)の使用経験			<0.001
ない	28 (50.9)	377 (89.8)	
ある	16 (29.1)	9 (2.1)	
わからない	11 (20.0)	32 (7.6)	

表6. 大麻使用別にみた対象者の依存症に関する意識・考え

	大麻使用				p-value
	経験群		非経験群		
	n=55	n=382	n=382	n=382	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
薬物使用の規制に対する考え					
違法・合法に関わらず薬物は規制すべき	11	(20.0)	281	(66.9)	<0.001
合法なものは個人の判断に任せるべき	23	(41.8)	91	(21.7)	<0.001
違法・合法に関わらず個人の判断に任せるべき	8	(14.5)	9	(2.1)	<0.001
大麻など植物由来のものは規制すべきではない	22	(40.0)	17	(4.0)	<0.001
大麻など植物由来のものであっても規制すべき	3	(5.5)	61	(14.5)	0.064
薬物に対する日本の取り締まりは厳しすぎる	15	(27.3)	13	(3.1)	<0.001
薬物に対する日本の取り締まりは甘すぎる	6	(10.9)	76	(18.1)	0.185
いずれも当てはまらない	5	(9.1)	28	(6.7)	0.506
北米における大麻合法化に関する考え					<0.001
どのような目的でも反対	6	(10.9)	135	(32.1)	
医療目的は賛成だが、嗜好目的は反対	14	(25.5)	210	(50.0)	
医療目的は反対だが、嗜好目的は賛成	1	(1.8)	0	(0.0)	
どのような目的でも賛成	28	(50.9)	27	(6.4)	
いずれも当てはまらない・わからない	6	(10.9)	43	(10.2)	
ギャンブル依存の周知					0.263
知っている	46	(83.6)	373	(88.8)	
知らない	9	(16.4)	47	(11.2)	
インターネット・ゲーム障害の周知					0.025
知っている	43	(78.2)	373	(88.8)	
知らない	12	(21.8)	47	(11.2)	
周知している支援団体					
依存症専門病院	17	(30.9)	160	(38.1)	0.300
精神保健福祉センター	13	(23.6)	69	(16.4)	0.184
回復支援施設 (ダルクなど)	39	(70.9)	121	(28.8)	<0.001
自助グループ NA,AA など	13	(23.6)	13	(3.1)	<0.001
いずれも知らない	16	(29.1)	197	(46.9)	0.012
依存症の支援を必要としている人の存在					<0.001
いる	16	(29.1)	41	(9.8)	
いない	39	(70.9)	379	(90.2)	

表7. 大麻使用の目的・動機、併用薬物

	合計	
	n=34	
	n (%)	
大麻使用の目的・動機		
効果(ききめ)を楽しみたい	17	(50.0)
興味があった	14	(41.2)
モノの感じ方を変えたい	11	(32.4)
パーティーなどの特別な日に	8	(23.5)
睡眠の問題を改善したい	7	(20.6)
手に入りやすいから	6	(17.6)
大麻仲間からのプレッシャー	5	(14.7)
暇だった	5	(14.7)
身体への悪影響が少ないから	5	(14.7)
いやなことを忘れたい	4	(11.8)
不安な気持ちを和らげたい	3	(8.8)
酔った勢い	2	(5.9)
大麻使用時の併用薬物		
アルコール	22	(64.7)
タバコ	19	(55.9)
覚せい剤	8	(23.5)
危険ドラッグ	6	(17.6)
コカイン	6	(17.6)
MDMA	5	(14.7)
LSD	5	(14.7)
吸入剤	2	(5.9)
ヘロイン	2	(5.9)
その他	1	(2.9)