

令和5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)

危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と
乱用実態把握に関する研究

課題番号：21KC1003

総括研究報告書
分担研究報告書

令和6年3月

研究代表者：船田正彦

目 次

令和5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) (課題番号: 21KC1003)

危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と 乱用実態把握に関する研究

I. 令和5年度 総括研究報告書		
船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)	-----	1
II. 令和5年度 分担研究報告書		
研究-1: 新規オピオイド化合物の中樞作用とオピオイド受容体作用の関連性 -Butonitazene の薬理学的特性並びに薬物依存性の評価-	-----	15
船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)		
研究-2: 危険ドラッグと関連代謝物のインシリコによる活性予測法の開発	-----	27
栗原正明 (湘南医療大学 薬学部)		
研究-3: 危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる 標的生体分子系の探索研究-3	-----	32
浅沼幹人 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科)		
研究-4: フェンタニル類似体の摂取証明に向けた代謝挙動の研究	-----	42
北市清幸 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)		
研究-5: 大麻を乱用する少年における新たな大麻関連製品、 危険ドラッグの乱用実態に関する研究	-----	56
嶋根卓也 (国立精神・神経医療研究センター)		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	65

総括研究報告書

危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と
乱用実態把握に関する研究

研究代表者 船田正彦

(湘南医療大学 薬学部)

【研究要旨】

危険ドラッグは、海外では新規精神活性物質(New psychoactive substances, NPS)と称され、その流通は継続している。流通している危険ドラッグのタイプとしては、合成カンナビノイドやカチノン系化合物に加え、近年は大麻含有成分である Δ^9 -THCの誘導体である半合成カンナビノイドやフェンタニル類縁化合物などのオピオイド化合物の台頭が深刻である。本研究では、オピオイド化合物およびカチノン系化合物について、行動薬理学的特性および細胞毒性とオピオイド μ 受容体作用強度の相関性に関する検討を行った。また、化学計算によるインシリコ評価法を用いて大麻の精神活性物質である Δ^9 -THC、 Δ^8 -THCおよびそれぞれの類縁体である半合成カンナビノイドについてカンナビノイドCB₁受容体活性予測を行った。同様に、危険ドラッグの検出手法を明確にする目的で、フェンタニル類似化合物の代謝産物の検出手法に関する基盤研究を行なった。また、新規乱用薬物の研究および評価の際の基礎資料を提供する目的で、10代の大麻使用少年を対象に大麻ベープを含む大麻の使用実態および危険ドラッグを含む大麻以外の違法薬物の使用実態に関する疫学調査の立案を試みた。

【研究-1：新規オピオイド化合物の中樞作用とオピオイド受容体作用の関連性】

本研究では、危険ドラッグである2-[(4-butoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine (butonitazene)について、オピオイド受容体作用の解析、運動活性に対する影響、精神依存性並びに細胞毒性の有無を検討した。1) オピオイド受容体作用：CHO- μ 受容体発現細胞を利用して、butonitazeneのオピオイド受容体作用を解析した。Butonitazeneの添加により、濃度依存的な蛍光発光が確認された。この作用は、 μ 受容体拮抗薬(β -FNA)の前処置により完全に抑制された。Butonitazeneは μ 受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。2) 行動解析：Butonitazeneによる運動活性に対する影響を検討した。Butonitazeneの投与により、用量依存的な運動促進作用が発現した。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬であるnaloxone、ドパミンD1受容体拮抗薬であるSCH23390およびドパミンD2受容体拮抗薬であるraclopride前処置によって有意に抑制された。Butonitazeneの運動促進作用は、ドパミン受容体を介して発現することが明らかになった。3) 精神依存性の評価：薬物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。Butonitazeneの条件付け(1日1回6日間、3:薬物、3:溶媒)を行い、butonitazeneの条件付けによって有意なCPPの発現が確認された。Butonitazene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。4) 培養細胞による毒性評価：マウスforebrainの初代培養神経細胞を使用して、butonitazene添加による細胞生存率の評価

を行った。Butonitazene 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、butonitazene は強力な中枢興奮作用と精神依存形成能を有することが明らかになった。Butonitazene の中枢興奮作用の発現並びに精神依存形成には、ドパミン神経系が関与している可能性が示唆された。また、高濃度の薬物を処置することにより、細胞毒性の発現も確認された。したがって、butonitazene の乱用により、重篤な健康被害の発生が危惧される。Butonitazene は強力な中枢作用と精神依存形成能を有することが確認された。ターゲット受容体発現細胞による薬理学的実験、動物実験では運動活性の評価および CPP 法を併用することで迅速かつ客観的な依存性予測が可能となると考えられる。

[研究-2：危険ドラッグと関連代謝物のインシリコによる活性予測法の開発]

危険ドラッグ及び関連化合物の速やかな規制のために、それらの迅速な評価法開発が求められる。その目的においてインシリコ活性予測法は有効な評価法のひとつになり得ると考えられる。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である HHC 類縁体の活性予測を行い、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した。活性既知のカンナビノイド (THC: tetrahydrocannabinol 類縁体) を用いて QSAR (定量的構造活性相関) 解析を行った。作成した QSAR 式を用いて活性が未知の半合成カンナビノイド HHC 類縁体の活性予測を行った。良好な QSAR 式を得ることができた。 $(R^2 = 0.979)$ 得られた QSAR 式を用いて HHC 類縁体 6 種の活性予測を行った。

[研究-3：危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる標的生体分子系の探索研究-3]

ドパミン・セロトニントランスポーター(DAT・SERT)への直接作用が危険ドラッグ/乱用薬物の神経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられたので、これまで2年度にわたり、培養細胞を用いた検討を行ってきた。ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミン(DAtracer) および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーでのアッセイ系を構築することができ、いくつかのフェネチルアミン系、ピペラジン系のドラッグが DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。一方、非細胞 *in vitro* 評価系を確立するためには、DAT 蛋白のみならず連関蛋白の存在が重要と考えられる。そこで今年度は、脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。マウス線条体の粗膜分画に DAtracer を反応させ、クリック反応による蛍光標識を行ったところ、DAtracer の DAT への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた。また、フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これら危険ドラッグ/乱用薬物の DAT あるいはドパミンレセプターへの競合拮抗と考えられる作用は、昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーの結果と 4FMP を除いて同様の結果であった。用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。

[研究-4：危険ドラッグの生体内挙動とその有害性に関する研究]

近年、合成カンナビノイド (SCs) およびフェンタニルとその類似体の乱用が世界各国で増加して

おり、薬物動態パラメータの特定および代謝挙動の解明が望まれている。本研究では、薬物動態パラメータの特定を目的として、SCs を用いた *in vitro* 実験から薬物動態パラメータを算出する有用性および薬物動態パラメータに影響を与える因子についての検討を行った。また、代謝挙動の解明を目的として、フェンタニル類似体 (FAs) を用いた位置異性体識別方法の確立および N-アシル基の炭素数の差異による代謝挙動の比較を行った。SCs として CUMYL-PINACA および 5F-CUMYL-PINACA を用い *in vitro-in vivo* 比較 (IVIVC) による、1) より実測に近い薬物動態パラメータ特定の実施を、FAs として FFF、3-PPF および BZF を用い、2) FAs の測定法の確立と代謝挙動の解明、3) FAs のフッ素位置異性体識別および、4) ヒト肝ミクロソームを用いた代謝挙動の比較、5) N-アシル基の炭素数の差異による代謝挙動の比較および摂取証明に向けたバイオマーカーの特定を行った。1) では、*in vitro* 実験から算出された推定肝クリアランス (CLH) の推定範囲に *in vivo* 実験から算出された CL_{bile} の値が含まれていた。FAs を用いた 2) では、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝反応において nor 代謝物、アミド加水分解生成物、一水酸化体の 3 種類の第 I 相代謝物が確認された。3) では、既報を参考に GC-MS の測定条件を設定することで、3 種の位置異性体を分離することができた。4) では、FFF のいずれのフッ素位置異性体においても同様の 3 種類の第 I 相代謝物が推定されたが、代謝物生成量比には異性体間で差がみられた。5) では、N-アシル基の炭素数と水酸化代謝反応との関係性を確認し、摂取証明のためのバイオマーカーを特定した。

[研究-5：大麻を乱用する少年における新たな大麻関連製品、危険ドラッグの乱用実態に関する研究]

近年、電子タバコ (ベイパー) で使用するワックスやリキッドタイプの大麻製品 (Vaping Marijuana: 以下、大麻ベイプと表記) が押収される事件が増加している背景を受け、本研究では 10 代の大麻使用少年における大麻ベイプを含む大麻の使用実態および大麻ベイプ使用者の心理社会的な特徴を明らかにすることを目的とした。福岡県保健医療介護部が実施する大麻支援プログラム (F-CAN) に参加した大麻使用少年のうち、研究参加の同意が得られた 20 名を研究対象とした。プログラム実施協力機関の担当者による面接および少年による自記式調査により、必要な情報を収集した。対象者の 85% に過去 1 年以内の大麻ベイプ使用が認められた。大麻ベイプ使用者は全員が乾燥大麻も併用していた。一方、危険ドラッグを併用していたのは 11.8% にとどまった。大麻ベイプを使用する少年は、使用しない少年に比べて、薬物関連問題の重症度 (DAST-20 スコア) が高く (ベイプ群 8.9 点、対照群 4.3 点)、大麻使用日数が多く (ベイプ群 5.0 日、対照群 0.3 日)、過去 1 年以内にビンジ飲酒を経験している割合が高い傾向がみられたが (ベイプ群 82.4%、対照群 33.3%)、いずれも有意差は検出されなかった。大麻ベイプのメリット・デメリットとしては、「乾燥大麻の喫煙に比べて、少ない手順・準備で使うことができ便利である」というメリットや、「乾燥大麻の喫煙に比べて、値段が高い (単価が高い、電子タバコの器具が高い)」というデメリットを選択する回答が多かった。

結論：(1) 本研究により、butonitazene は強力な中枢興奮作用と精神依存形成能を有することが明らかになった。オピオイド化合物について中枢興奮作用の発現並びに精神依存形成には、オピオイド μ 受容体作用が関与している可能性が示唆された。本研究の解析から、オピオイド化合物による中枢興奮作用および精神依存性の発現強度は、オピオイド μ 受容体作用強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞による機能解析から、オピオイド化合物の中枢興奮作用や精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。(2) 活性既知のカンナビノイド (THC: tetrahydrocannabinol 類縁体) を用いて QSAR (定量的構造活性相関) 解析を行った。作成した QSAR 式を用いて活性が未知の半合成カンナビノイド HHC 類縁体の活性予測を行った。活性が既知のカンナビノイド類縁体のうち側鎖の炭素鎖が異なる化合物 14 個を母集団とし、MOE に搭載された

AutoQSAR を用いて QSAR 式を作成した。作成した QSAR 式を用いて HHC 類縁体の 6 化合物のマトリックスを作った。これにより HHC 類縁体の総括規制に供するデータとなると考えている。(3) 脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これらの危険ドラッグ/乱用薬物がアルキン化ドパミンの DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗していることを示していると考えられる。用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。(4) SCs の IVIVC の結果、肝代謝を受けたものは全て胆汁排泄を受けている可能性が示唆された。このことから、脂溶性の高い SCs では血中遊離型分率を算出することが重要であり、これによってさらにヒトでの生体内挙動の推測を正確に行うことができる可能性が示唆された。ヒト肝ミクロソームを用いた FAs の代謝実験では、親化合物の半減期が短い化合物では、ヒトにおいても体内からの消失が速やかに起こると考えられ、摂取証明に代謝物の特定が有用であることが示唆された。SCs および FAs の測定系の確立により、規制薬物の厳密な同定が可能であることが明らかとなった。さらに、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験はヒトでの代謝、毒性予測において有用であることが示唆された。今後より多くの FAs の代謝プロファイルを明らかにすることで、構造代謝関連の理解に貢献できると考えられた。(5) 大麻ベイプは、10 代の大麻使用少年たちの間で広く浸透していることが明らかとなった。高濃度の THC を含有する大麻ベイプ使用者は、非使用者よりも薬物関連問題が高く、大麻の使用頻度が高いなどの傾向がみられるものの、サンプルサイズの影響により有意差は検出できなかった。大麻ベイプ使用者の心理社会的な特徴を見出すためには、今後、対象者のさらなるリクルートが必要である。

本研究成果から、危険ドラッグの行動解析および細胞や化学計算による機能評価を含む評価システムは、危険ドラッグの中樞作用および有害作用発現の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。また、危険ドラッグおよびその代謝物同定の手法についても、機器条件や生体成分からの抽出法などの解析が進んだ。危険ドラッグの代謝物の同定は、危険ドラッグの使用根拠を証明する検出マーカーとして有用性が高く、解析手法の確立は重要であると考えられる。今後は、評価システムおよび検出システムともに、危険ドラッグの種類を増やし更なる検討が必要である。実態調査については、危険ドラッグに加え、近年は大麻の乱用拡大が顕著であることから、大麻および濃縮製品についても乱用状況を把握していく予定である。危険ドラッグの流通規制並びに薬物乱用防止の啓発に役立つ情報として利用できるよう取りまとめを行う予定である。

研究代表者：船田正彦
湘南医療大学 薬学部 教授

分担研究者：栗原正明
湘南医療大学 薬学部 教授

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
脳神経機構学分野 教授

分担研究者：北市清幸
岐阜薬科大学
薬物動態学研究室 教授

分担研究者：嶋根卓也
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
心理社会研究室 室長

A. 研究目的

国際的な潮流を見ると、精神作用を示す新しい化合物が新規精神活性物質(New psychoactive substances, NPS)として流通しており、その乱用が大きな社会問題となっている。NPSについては、国内では数年前に、「脱法ハーブの乱用問題」として表面化したことは記憶に新しい。現在は、こうしたNPSは、「危険ドラッグ」の呼称に統一されている。流通している危険ドラッグのタイプとしては、合成カンナビノイドやカチノン系化合物に加え、近年はフェンタニル類縁化合物などのオピオイド系薬物の台頭が深刻である。

危険ドラッグ蔓延における最大の問題点は、国内で流通する段階では、その多くが「未規制化合物」である点である。しかしながら、その作用は麻薬や覚せい剤と類似した効果を示すのである。特に、合成カンナビノイドは多くの類縁体の存在が知られており、特定の薬物を規制しても、次々に新しい薬物が登場する状況が続いていた。こうした状況を打破するために、危険ドラッグの有害作用を迅速に評価することが重要である。

本研究では、フェンタニル類縁化合物、合成カンナビノイド、カチノン系化合物について行動特性もしくは細胞毒性の解析を行い、評価法の妥当性について検討した。また、危険ドラッグを速やかに規制するためには、中枢作用の蓋然性に関する迅速な評価が必要である。それには、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ活性予測法が有効である。本研究は、大

麻含有成分であるカンナビノイド (THC: tetrahydrocannabinol 類縁体)、 Δ^9 -THC、 Δ^8 -THC およびそれぞれの類縁体 (半合成カンナビノイド) について、QSAR (定量的構造活性相関) 解析によりカンナビノイド CB1 受容体活性予測を行った。

一方、オピオイド化合物やカチノン系化合物といった危険ドラッグが数多く流通していることから、各系統の危険ドラッグの作用点 (薬物受容体等) に着目し、迅速に毒性等の有害作用を検出する評価システムの構築が重要である。そこで、本研究では、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毒性発現動態について検討した。オピオイド化合物については、オピオイド μ 受容体発現細胞による作用強度について検討した。同様に、カチノン系化合物に関してはドパミントランスポーター (DAT) を発現している神経細胞を用いて、DAT への作用を標的とした危険ドラッグの有害性スクリーニングの可能性について検討した。

同様に、救急医療現場では、健康被害の原因となり得る危険ドラッグの生体からの検出が課題となっている。本研究では、フェンタニル類縁化合物に着目し、摂取した危険ドラッグおよびその代謝物の検出法について検討した。一方、危険ドラッグの取締りにおいては、強化が進んでいる。しかしながら、取締りの強化により、危険ドラッグの流通はアンダーグラウンド化していく傾向があり、その乱用の実態把握はきわめて重要になっている。危険ドラッグに関する乱用実態を把握することは、流通している薬物の情報が収集できるとともに、薬物乱用防止対策の立案、遂行の基礎資料として重要である。

本研究では、フェンタニル類縁化合物、合成カンナビノイド、カチノン系化合物について行動特性もしくは細胞毒性の解析を行い、評価法の妥当性について検討した。また、化学計算によるインシリコ評価法を用いて半合成カンナビノイドのカンナビノイド CB1 受容体活性予測を行った。同様に、危険ドラッグの検出手法を明確にする目的で、フェンタニル類縁化合物、

合成カンナビノイドを用いて、*in vitro* および *in vivo* 実験から薬物動態パラメータおよび代謝挙動に関する研究を行った。また、フェンタニル類縁化合物のフッ素位置異性体識別法の確立およびアミド側鎖の構造代謝相関の研究を実施した。また、新規乱用薬物の研究および評価の際の基礎資料を提供する目的で、10代の大麻使用少年における大麻ベープを含む大麻の使用実態および大麻ベープ使用者の心理社会的な特徴に関する疫学調査を試みた。

B. 各研究の目的、方法、結果

[研究-1: 新規オピオイド化合物の中枢作用とオピオイド受容体作用の関連性]

船田正彦

湘南医療大学 薬学部 教授

本研究では、危険ドラッグである 2-[(4-butoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine (butonitazene) について、オピオイド受容体作用の解析、運動活性に対する影響、精神依存性並びに細胞毒性の有無を検討した。1) オピオイド受容体作用: CHO- μ 受容体発現細胞を利用して、butonitazene のオピオイド受容体作用を解析した。Butonitazene の添加により、濃度依存的な蛍光発光が確認された。この作用は、 μ 受容体拮抗薬 (β -FNA) の前処置により完全に抑制された。Butonitazene は μ 受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。2) 行動解析: Butonitazene による運動活性に対する影響を検討した。Butonitazene の投与により、用量依存的な運動促進作用が発現した。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬である naloxone、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬である raclopride 前処置によって有意に抑制された。Butonitazene の運動促進作用は、ドパミン受容体を介して発現することが明らかになった。3) 精神依存性の評価: 薬物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。Butonitazene の条件付

け (1日1回6日間、3:薬物、3:溶媒) を行い、butonitazene の条件付けによって有意な CPP の発現が確認された。Butonitazene 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。4) 培養細胞による毒性評価: マウス forebrain の初代培養神経細胞を使用して、butonitazene 添加による細胞生存率の評価を行った。Butonitazene 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、butonitazene は強力な中枢興奮作用と精神依存形成能を有することが明らかになった。Butonitazene の中枢興奮作用の発現並びに精神依存形成には、ドパミン神経系が関与している可能性が示唆された。また、高濃度の薬物を処置することにより、細胞毒性の発現も確認された。したがって、butonitazene の乱用により、重篤な健康被害の発生が危惧される。Butonitazene は強力な中枢作用と精神依存形成能を有することが確認された。ターゲット受容体発現細胞による薬理学的実験、動物実験では運動活性の評価および CPP 法を併用することで迅速かつ客観的な依存性予測が可能となると考えられる。

[研究-2: 危険ドラッグと関連代謝物のインシリコによる活性予測法の開発]

栗原正明

湘南医療大学 薬学部 教授

危険ドラッグの速やかな規制が求められており、そのための迅速な評価法開発が急務となっている。迅速な評価法構築を支援するツールとして、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した。カンナビノイド (THC: tetrahydrocannabinol 類縁体) の包括規制を見据えた、カンナビノイド類縁体の QSAR (定量的構造活性相関) 解析を行うことを目的とした。文献既知のカンナビノイド類縁体の化合物

14 個を母集団とし、統合計算化学システム MOE に搭載された AutoQSAR を用いて QSAR 式を作成した。

MOE を用いて作成した良好な QSAR 式を下に示した。

$$\begin{aligned} \text{pKi} = & \\ & -2.249525 \\ & +0.0092104 * \text{PEOE_VSA}+2 \\ & +0.059427 * \text{SMR_VSA}5 \\ & +0.074415 * \text{SlogP_VSA}7 \\ & +0.069448 * \text{SlogP_VSA}8 \\ R^2 = & 0.979 \end{aligned}$$

PEOE_VSA+2、SMR_VSA5、SlogP_VSA7、SlogP_VSA8 は MOE の記述子である。

この QSAR 式を用いて、活性未知の HHC 類縁体 (HHCV, HHCB, HHC, HHCH, HHCP, HHCjd) の活性を予測した。

[研究-3: 危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる標的生体分子系の探索研究-3]

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

昨年度は、ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーでのアッセイ系を構築することができ、いくつかのフェネチルアミン系、ピペラジン系のドラッグが DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。一方、非細胞 in vitro 評価系を確立するためには、DAT 蛋白のみならず関連蛋白の存在が重要と考えられる。

そこで、今年度はマウス線条体組織から得た粗膜分画標品にゼラチンコートした 96 穴プレート上で直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、標識ドパミンと危険ドラッグ/乱用薬物の DAT への競合反応の有無を検出するクリックケミストリーでのアッセイ系の構築を試みた。

マウス線条体の粗膜分画に DAtracer を反応させ、蛍光アジドとのクリック反応によりドパミンを蛍光標識するクリックケミストリーを行い蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光強度測定を行ったところ、DAtracer (50 μM)の DAT への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた。

また、DAtracer (50 μM)とともにフェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物(各最終濃度 50 μM)の添加を行ったところ、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。しかし、今回用いた濃度(各最終濃度 50 μM)では methylone, 4FMP, PP での DAtracer の蛍光シグナルの明らかな抑制は認められなかった。

[研究-4: 危険ドラッグの生体内挙動とその有害性に関する研究]

北市清幸
岐阜薬科大学
薬物動態学研究室 教授

合成カンナビノイド(SCs)として CUMYL-PINACA [1-pentyl-N-(2-phenylpropan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxamide] および 5F-CUMYL-PINACA [1-(5-fluoropentyl)-N-(2-phenylpropan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxamide] を、フェンタニル類似体(FAs)として fluorofranylfentanyl (FFF)、3-phenylpropanoylfentanyl [N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidyl]-3-phenylpropan amide or 3-PPF] および benzoylfentanyl [N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidyl]benzamide or BZF] を用

いた。まず、CUMYL-PINACA と 5F-CUMYL-PINACA の IVIVC による、より実測に近い薬物動態パラメータの特定を試みた。*In vitro* 薬物動態パラメータの算出を行った結果、脂溶性の高い SCs は血中遊離型分率が小さく、これが *in vitro* 実験と *in vivo* 実験での結果の差異を引き起こしていることが明らかとなった。また、IVIVC の結果、*in vitro* 実験から算出された推定肝クリアランス (CLH) の推定範囲に *in vivo* 実験から算出された CLbile の値が含まれていた。肝代謝を受けたものは全て胆汁排泄を受けている可能性が示唆された。次に、*p*-FFF の測定方法の確立と *in vitro* 代謝実験を試みた。LCMS-IT-TOF、LC-MS/MS を用いて *p*-FFF 測定方法の確立を行った。また、SCs で確立した *in vitro* 実験の方法に一部変更を加えた方法によって、代謝物の検出についても可能であった。

次に、FFF のフッ素位置異性体である *o*-FFF、*m*-FFF、*p*-FFF をモデル化合物とし、親化合物のカラム分離による異性体識別および *in vitro* 代謝実験による代謝挙動の解明を試みた。LC-MS/MS では 3 種の FFF 位置異性体は C8、C18、PFP、Cholester、 π NAP の 5 つのいずれのカラムでも完全分離は行えなかったが、GC-MS により分離することができた。また、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験では、いずれの位置異性体においても前年度 *p*-FFF で得られた代謝物と同様の 3 種の第 I 相代謝物が推定されたが、代謝物生成量比に異性体間で差がみられた。

最後に、3-PPF および BZF をモデル化合物とし、アミド側鎖による構造代謝相関の解明を試みた。ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験により、半減期は 3-PPF で 7.9 分、BZF で 85.4 分と算出された。3-PPF の代謝物としては酸化 N-脱アルキル化体 (nor 体) の一水酸化体、nor 体、一水酸化体が検出された。BZF の代謝物としては nor 体、アミド加水分解体、一水酸化体が検出された。3-PPF の一水酸化体は反応初期に一過性に生成されたが、BZF では生成は緩徐であり相違が認められた。LCMS-IT-TOF 分析により、両 FAs 代謝物の水酸基の位置を決定することでアミド側鎖の伸長により水

酸化反応の反応部位が変化し、より N-アシル基で水酸化を受けやすくなることが確認された。よりアミド側鎖の長い 3-PPF は N-アシル基の水酸化反応によって速やかに消失することが明らかになった。

[研究-5: 大麻を乱用する少年における新たな大麻関連製品、危険ドラッグの乱用実態に関する研究]

嶋根卓也

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
心理社会研究室 室長

本研究では、福岡県保健医療介護部が実施する大麻支援プログラム (F-CAN) に参加した大麻使用少年のうち、研究参加の同意が得られた 20 名を研究対象とした。プログラム実施協力機関の担当者による面接および少年による自記式調査により、必要な情報を収集した。本研究の実施にあたり、主として大麻パイプを使用する少年は、主として従来の乾燥大麻を使用する少年に比べて、薬物関連問題の重症度が高いという仮説を立て、薬物関連問題の重症度 (DAST-20 スコア) をプライマリーエンドポイントとした。

本研究の実施にあたっては、説明文書を用いて研究対象者に通知し、研究対象者が研究対象になることを拒否できる機会を保障するために、アンケート用紙の冒頭で、研究参加への同意の有無をチェックボックスにて確認した。なお、未成年者に該当する場合、本人および保護者の双方から同意を得た。また、研究開始後に、同意を撤回する場合は、F-CAM 担当者を窓口とし、福岡県薬務課を介して、研究責任者に報告する流れとした。本研究の研究計画書は、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 A2021-124)。

対象者の 85% に過去 1 年以内の大麻パイプ使用が認められた。大麻パイプ使用者は全員が乾燥大麻も併用していた。一方、危険ドラッグを併用していたのは 11.8% にとどまった。大麻ベ

イプを使用する少年は、使用しない少年に比べて、薬物関連問題の重症度 (DAST-20 スコア) が高く (ベープ群 8.9 点、対照群 4.3 点)、大麻使用日数が多く (ベープ群 5.0 日、対照群 0.3 日)、過去 1 年以内にビンジ飲酒を経験している割合が高い傾向がみられたが (ベープ群 82.4%、対照群 33.3%)、いずれも有意差は検出されなかった。大麻ベープのメリット・デメリットとしては、「乾燥大麻の喫煙に比べて、少ない手順・準備で使うことができ便利である」というメリットや、「乾燥大麻の喫煙に比べて、値段が高い (単価が高い、電子タバコの器具が高い)」というデメリットを選択する回答が多かった。

C. 考 察

1. 新規オピオイド化合物の中樞作用とオピオイド受容体作用の関連性

本研究により、butonitazene は強力な中樞興奮作用と精神依存形成能を有することが明らかになった。Butonitazene を含む nitazene 系化合物は公衆衛生上の脅威となりうると考えられる。Butonitazene の中樞興奮作用の発現並びに精神依存形成には、オピオイド μ 受容体作用が関与している可能性が示唆された。本研究の解析から、オピオイド化合物による中樞興奮作用および精神依存性の発現強度は、オピオイド μ 受容体作用強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞による機能解析から、オピオイド化合物の中樞興奮作用や精神依存性などの有害作用を推測できる可能性が示唆された。したがって、本研究で確認された動物実験と細胞による総合的な有害作用評価システムは、オピオイド化合物包括指定範囲の確定のために貢献できる解析手法であると考えられる。

2. 危険ドラッグと関連代謝物のインシリコによる活性予測法の開発

本研究では、記述子を 4 つ用いた良好な QSAR 式を得ることができた ($R^2 = 0.979$)。

得られた QSAR 式を用いて HHC 類縁体 (HHCV, HHCB, HHC, HHCH, HHCP, HHCjd) の活性予測を行った。

これにより $n = 3 \sim 8$ の Δ^8 、 Δ^9 -THC の化合物 12 個のマトリックスを完成することができた。

記述子を 2 つ用いた良好な QSAR 式を得ることができた。 ($R^2 = 0.978$)

得られた QSAR 式を用いて Δ^9 -THC 類縁体、 Δ^8 -THC 類縁体の活性予測を行った。これにより $n = 3 \sim 8$ の Δ^8 -THC、 Δ^9 -THC の化合物 12 個のマトリックスを完成することができた。今後、評価化合物を増やして検討を行うことにより、合成カンナビノイド包括規制への展開が期待される。

3. 危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる標的生体分子系の探索研究-3

危険ドラッグ/類似関連化合物の DAT への作用の有無を評価するにあたり、ドパミンの DAT への作用を非 RI により可視化する方法として、蛍光標識ドパミンを細胞膜上の DAT に作用させ方法が考えられるが、分子量の大きい蛍光物質によりドパミンの DAT への結合、取り込みが阻害されてしまう可能性が高い。そこで、昨年度の細胞系での検討と同様に、アルキン化ドパミン (DAtracer) を脳組織粗膜分画標品に反応させ DAT に結合させた後に蛍光アジドとのクリック反応によりドパミンを蛍光標識するクリックケミストリーの手法を用いた。DAtracer の粗膜分画標品への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた。さらにこの蛍光シグナルがフェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物の同時添加により抑制され、昨年度の細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーと一部のドラッグを除いて同様の結果が得られたことから、これらの乱用薬物/危険ドラッグが DAtracer の DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗しているこ

とを示していると考えられた。

4. 危険ドラッグの生体内挙動とその有害性に関する研究

SCs を用いた研究より、肝代謝を受けたものは全て胆汁排泄を受けている可能性が示唆された。また、SCs と同様に検出技術の確立とデータの蓄積を行うことで国内での規制に役立つ可能性が示唆された。

FFF 摂取のマーカーとしては、FFF 由来のフラン環やアニリン環を持つ nor 体が有用であると考えられた。3 種の FFF 位置異性体において 3 つの同様な第 I 相代謝物が推定されたが、異性体間で代謝物の生成量や保持時間に差がみられたことから、それらを組み合わせることで、代謝物の情報を用いて FFF 位置異性体を識別できる可能性が示唆された。

FAs の構造代謝相関として、よりアミド側鎖の長い FAs は N-アシル基で水酸化を受けやすく、水酸化反応によって速やかに消失する可能性が示唆された。アミド側鎖の長い FAs は、親化合物の検出は摂取証明に適さないことが示唆され、摂取証明のためのバイオマーカーとしては nor 代謝物が利用可能であることが示唆された。

5. 大麻を乱用する少年における新たな大麻関連製品、危険ドラッグの乱用実態に関する研究

対象者の 85% に大麻パイプの使用が認められた。この結果は、少年たちの間で、従来の乾燥大麻だけではなく、電子タバコ型の大麻パイプが広く浸透していることを示唆している。また、少年たちは、大麻パイプにはメリット・デメリットの両面があることを認識していた。大麻パイプを使用する少年の心理社会的な特徴として、大麻の使用頻度が高い、薬物関連問題の重症度が高い、ビンジ飲酒経験があるといった傾向が確認されたが、有意差を検出することができなかった。これは恐らく、対照群（大麻パイプを使っていない少年）が少ないことによる検

出力の問題と考えられる。十分な対象者が確保できなかった背景には、大麻を使用する少年たちの治療動機は決して高くはなく、プログラムにつながりにくい結果となったことが考えられる。

D. 結論

本研究の解析から、オピオイド化合物による中枢興奮作用および精神依存性の発現強度は、オピオイド μ 受容体作用強度と相関することが明らかになった。したがって、CHO- μ 細胞による機能解析から、オピオイド化合物の中枢興奮作用や精神依存性などの有害作用を推測できることが示唆された。本研究の行動解析および細胞解析データパターンを拡大することで、オピオイド化合物の包括指定が可能であると考えられる。

コンピュータを用いた化学計算による危険ドラッグの作用強度予測法に関する研究には、QSAR (定量的構造活性相関) を使用した。活性が既知のカンナビノイド類縁体のうち側鎖の炭素鎖が異なる化合物 14 個を母集団とし、MOE に搭載された AutoQSAR を用いて QSAR 式を作成した。作成した QSAR 式を用いて HHC 類縁体の 6 化合物のマトリックスを作った。これにより HHC 類縁体の総括規制に供するデータとなると考えている。

脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methylene の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これらの危険ドラッグ/乱用薬物がアルキン化ドパミンの DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗していることを示していると考えられる。

用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今

後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。

危険ドラッグの代謝プロファイルに関する研究では、SCsを用いた研究から、脂溶性の高いSCsでは血中遊離型分率を算出することが重要であり、これによってさらにヒトでの生体内挙動の推測を正確に行うことができる可能性が示唆された。さらに、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験はヒトでの代謝、毒性予測において有用であることが示唆された。これらの知見は、SCs、FAsのみならず他の危険ドラッグの有害作用を予測する上で極めて有用な技術である。今回取り扱った化合物だけではなく、FAsの識別において、構造がわずかに異なるFAsにおいても、摂取証明のためには適切な代謝物を特定し、その代謝挙動を活用することが重要であることが示唆された。

本研究結果から、危険ドラッグの行動解析および細胞や化学計算による機能評価を含む評価システムは、危険ドラッグの中枢作用および有害作用発現の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。また、危険ドラッグおよびその代謝物同定の手法についても、機器条件や生体成分からの抽出法などの解析が進んだ。特に代謝物の同定は、危険ドラッグの使用根拠を証明するマーカーとして有用性が高いと考えられる。今後は、評価システムおよび検出システムともに、危険ドラッグの種類を増やし更なる検討が必要である。

実態調査については、大麻ベイプは、10代の大麻使用少年たちの中で広く浸透していることが明らかとなった。高濃度のTHCを含有する大麻ベイプ使用者は、非使用者よりも薬物関連問題が高く、大麻の使用頻度が高いなどの傾向がみられるものの、サンプルサイズの影響により有意差は検出できなかった。大麻ベイプ使用者の心理社会的な特徴を見出すためには、今後、対象者のさらなるリクルートが必要である。危険ドラッグの流通規制並びに薬物乱用防止

の啓発に役立つ情報として利用できるよう取りまとめを行う予定である。

E. 健康危険情報

本研究は、危険ドラッグ及び大麻の中枢作用、毒性および乱用実態把握に関する研究であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦:危険ドラッグの依存性. 精神科, 41: 239-247, 2022.
- 2) 船田正彦: 海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 54: 36-42, 2023.
- 3) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Multifunctional Metallothioneins as a Target for Neuroprotection in Parkinson's Disease. Antioxidants, 12(4): 894, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12040894>
- 4) Murata, H., Phoo, M.T.Z., Ochi, T., Tomonobu, N., Yamamoto, K., Kinoshita, R., Miyazaki, I., Nishibori, M., Asanuma, M. and Sakaguchi, M.: Phosphorylated SARM1 is involved in the pathological process of rotenone-induced neurodegeneration. J. Biochem., 174(6): 533-548, 2023. doi: 10.1093/jb/mvad068
- 5) Masai, K., Nakayama, Y., Shin, K., Sugahara, C., Miyazaki, I., Yasuhara, T., Date, I. and Asanuma, M.: Neurogenesis impairment with glial activation in the hippocampus-connected regions of intracerebroventricular streptozotocin-injected mice. Neurosci. Lett., 820: 137598, 2024. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137598
- 6) Moriya S, Funaki K, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.: Synthesis and

- properties of PNA containing a dicationic nucleobase based on N4-benzoylated cytosine.: Bioorg Med Chem Lett. 2023 May 15;88:129287.
- 7) Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.: Bis(nitrato-κO)(1,4,8,11-tetraaza-cyclo-tetra-decane-κ4 N)zinc(II) methanol monosolvate.: IUCrdata. 2022 Aug 31;7(Pt 8):x220854.
 - 8) Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T: PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA: *Peptide Science* 2021, 2022, 111-112
 - 9) Ito S, Mori M, Matsuo M, Yamasaki R, Oida Y, Soda M, Kitaichi K: Establishment to measure oxycodone in plasma with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Neuropsychopharmacol Rep*, 42(3): 299-305, 2022.
 - 10) 嶋根卓也: 大麻を使う若者たちとのコミュニケーションー有効な、有効ではない予防教育ー. 刑政 134(7) : 38-49, 2023.
 - 11) 嶋根卓也: 薬物問題の現状と課題ー疫学と国の対策ー. II アディクション各論ー1. 物質使用症, 精神科治療学第 38 巻増刊号 : 78-83, 2023.
 - 12) 嶋根卓也: 1 章 物質使用症群 物質使用症の疫学 薬物使用. 物質使用症又は嗜癖行動症群 性別不合 (講座 精神疾患の臨床) (樋口進 編), 中山書店, 東京, pp24-40, 2023.
 - 13) 嶋根卓也: Topics 大麻合法化とその影響. 物質使用症又は嗜癖行動症群 性別不合 (講座 精神疾患の臨床) (樋口進 編), 中山書店, 東京, pp161-169,2023.
 - 14) 嶋根卓也: 日本における薬物依存の現状. 第 10 章 10.1 薬物依存, アルコール・薬物・ギャンブル・ゲームの依存ケアサポート (樋口進 監修), 講談社, 東京, pp122-135, 2023.
2. 学会発表
- 1) 船田正彦: 危険ドラッグの最新海外事情, 第 20 回日本旅行医学会, Web 開催, 2022 年 5 月 21 日.
 - 2) 富澤幸菊、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋 秀依: フェンタニル誘導体の構造活性相関, 日本薬学会 第 140 年会, 札幌, 2022 年 3 月 25 日.
 - 3) 湯山円晴, 市丸 嘉, 荒井裕美子, 金谷貴行, 佐藤忠章, 船田正彦, 栗原正明: ドッキングスタディによる CB1 受容体リガンドの活性予測: 日本薬学会第 142 年会 2022/03/28) オンライン開催
 - 4) 湯山円晴, 三澤隆史, 出水庸介, 金谷貴行, 佐藤忠章, 栗原正明: ジフェニルメタン骨格を持つ新規 ERα アンタゴニストの創製: 日本薬学会第 142 年会 (2022/03/28)
 - 5) 浅沼幹人, 宮崎育子, 進 浩太郎, 都 明希, 小林壯太郎, 津田光希, 小野鈴香, 小川賢透, 正井加織: 脳・腸神経変性を再現できるパーキンソン病モデルにおける腸管バリア機能の破綻, 炎症反応. 第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台, 2023.3.18.
 - 6) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: 中脳神経細胞における α シヌクレイン発現とロテノン誘発神経障害へのグリア細胞部位特異性の関与. 第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台, 2023.3.19.
 - 7) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Sogawa, C., Sogawa, N., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Mesencephalic glia contributes to alpha-synuclein expression and neurotoxicity in parkinsonian model, 第 64 回日本神経学会学術大会, 千葉, 2023.6.1.
 - 8) 宮崎育子, 浅沼幹人: 部位特異的のアストロサイトーミクログリア連関がもたらすドパミン神経障害. シンポジウム: ミクログリア毒性学, 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19.
 - 9) 正井加織, 中山裕太, 進浩太郎, 宮崎育子, 浅沼幹人: ストレプトゾトシン脳室内投与

- 孤発性アルツハイマー病モデルマウスにおけるグリア細胞活性化の領域特異性. 第66回日本神経化学学会大会, 神戸, 2023.7.6.
- 10) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: ロテノン曝露による中脳神経細胞における α シヌクレイン発現誘導と神経障害へのグリア細胞部位特異性の関与. 第17回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres(MDSJ), 大阪, 2023.7.21.
 - 11) 浅沼幹人: 危険ドラッグの神経細胞毒性発現の蓋然性スクリーニングにむけた標的生体分子系の探索. シンポジウム: 危険ドラッグにおける乱用・流通規制の現状と研究の最前線, 第53回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 2023.9.7.
 - 12) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: パーキンソン病の環境要因農薬ロテノンによる中脳ドパミン神経障害と α シヌクレイン発現へのグリア部位特異性の関与. 第53回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 2023.9.7.
 - 13) 浅沼幹人, 一瀬愛花, 三澤一華, 小川賢透, 進浩太郎, 宮崎育子: メタロチオネイン発現を誘導するアストロサイトのセロトニン1A受容体刺激による神経突起伸長作用の検討. メタルバイオサイエンス研究会2023, 岐阜, 2023.10.5-6.
 - 14) 大環状ポリアミン-亜鉛錯体の単結晶X線結晶構造解析: 市丸 嘉, 加藤 紘一, 小池透, 黒崎 博雅, 栗原 正明: 日本薬学会第143年会 (2023/03)
 - 15) 市丸嘉, 加藤紘一, 栗原正明, 黒崎博雅: アントラセンを導入したBis(2-picolyl)amine誘導体-亜鉛錯体のDNA光切断活性: 第67回日本薬学会関東支部大会 (2023/9/16, 東京)
 - 16) Shun-suke Moriya, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Strand invasion by PNA containing preQ1: 第50回国際核酸化学シンポジウム (2023/11/1-3) 宮崎
 - 17) Shun-suke Moriya, Mai Kiyosue, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Properties of peptide nucleic acid containing n⁴-bis(aminomethyl)-benzoylated cytosine for enhanced DNA binding: 第60回ペプチド討論会 (2023/11/8-10) 滋賀
 - 18) 木下智絵, 森川美空, 伊藤宏輔, 曾田翠, 塚本桂, 岩木孝晴, 田中宏幸, 伊藤哲朗, 北市清幸: 合成カンナビノイドの代謝における種差に関する研究. 日本薬剤学会第36年会. Web, 2021年5月13-15日
 - 19) 森川美空, 木下智絵, 伊藤宏輔, 岩木孝晴, 曾田翠, 清水英徳, 田中宏幸, 細井紀也, 北市清幸: フェンタニル類似体Fluorofuranylfentanylの異性体識別と代謝物の同定に関する研究. 日本薬学会第142年会. 名古屋, 2022年3月25-28日
 - 20) 伊藤宏輔, 森川美空, 岩井康晴, 木下智絵, 岩木孝晴, 曾田翠, 清水英徳, 田中宏幸, 篠田範夫, 北市清幸: フェンタニル類似体の摂取証明に向けた識別法の開発に関する研究. BPCNP4学会合同年会. 東京, 2022年11月4-6日
 - 21) Oida Y, Morikawa M, Itoh K, Iwai K, Iwaki T, Soda M, Shimizu H, Tanaka H, Shinoda N, Kitaichi K: The establishment of the method to differentially identify the isomers of a fentanyl analog, Fluorofuranylfentanyl. 34th CINP World Congress, Montréal, Canada, 2023.5.7-10.
 - 22) 岩井康晴, 伊藤宏輔, 森川美空, 木下智絵, 曾田翠, 種田靖久, 北市清幸: フェンタニル類似体 benzoylfentanyl および 3-phenylpropanoylfentanyl の摂取証明に向けた代謝研究. 第53回日本神経精神薬理学会年会. 東京, 2023年9月7-9日
 - 23) Nakashima M, Kodama N, Mori H, Shimane T: Development of juvenile cannabis relapse prevention program (F-CAN) focusing on communication skills with familiar people. 10th World Congress of Cognitive and Behavior Therapies. Soul, 2023.6.1.

G. 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

分担研究報告書

新規オピオイド化合物の中樞作用とオピオイド受容体作用の関連性
-Butonitazene の薬理学的特性並びに薬物依存性の評価-

研究分担者：船田正彦（湘南医療大学 薬学部 薬理学研究室）

協力研究者：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】

本研究では、危険ドラッグである 2-[(4-butoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-5-nitro-1H-benzimidazole-1-ethanamine (butonitazene) について、オピオイド受容体作用の解析、運動活性に対する影響、精神依存性並びに細胞毒性の有無を検討した。

1) オピオイド受容体作用：CHO- μ 受容体発現細胞を利用して、butonitazene のオピオイド受容体作用を解析した。Butonitazene の添加により、濃度依存的な蛍光発光が確認された。この作用は、 μ 受容体拮抗薬 (β -FNA) の前処置により完全に抑制された。Butonitazene は μ 受容体を介して薬理作用が発現すると考えられる。2) 行動解析：Butonitazene による運動活性に対する影響を検討した。Butonitazene の投与により、用量依存的な運動促進作用が発現した。これらの効果は、オピオイド受容体拮抗薬である naloxone、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬である raclopride 前処置によって有意に抑制された。Butonitazene の運動促進作用は、ドパミン受容体を介して発現することが明らかになった。3) 精神依存性の評価：薬物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。Butonitazene の条件付け (1日1回6日間、3:薬物、3:溶媒) を行い、butonitazene の条件付けによって有意な CPP の発現が確認された。Butonitazene 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。4) 培養細胞による毒性評価：マウス forebrain の初代培養神経細胞を使用して、butonitazene 添加による細胞生存率の評価を行った。Butonitazene 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、butonitazene は強力な中樞興奮作用と精神依存形成能を有することが明らかになった。Butonitazene の中樞興奮作用の発現並びに精神依存形成には、ドパミン神経系が関与している可能性が示唆された。また、高濃度の薬物を処置することにより、細胞毒性の発現も確認された。したがって、butonitazene の乱用により、重篤な健康被害の発生が危惧される。Butonitazene は強力な中樞作用と精神依存形成能を有することが確認されたことから、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

ヘロインを始めとするオピオイド系薬物の乱用は過量摂取による死亡など、重篤な健康被害

を及ぼす^{1,2)}。近年、フェンタニルやフェンタニル類縁化合物とは構造が異なる新規オピオイド化合物の流通が拡大しており、乱用に基づく健康被害は大きな社会問題となっている^{3,4,5)}。

しかしながら、危険ドラッグとして流通している新規オピオイド化合物については、その薬理作用や有害作用について、不明な点が多い。

本研究では butonitazene の薬理学的特性および中枢作用を明確にする目的で、1) オピオイド受容体作用、2) 運動活性に対する影響、3) 報酬効果、および4) 細胞毒性について検討を行った。

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。本動物実験は、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの動物実験倫理問題検討委員会により承認された動物実験計画書に従って実施した (承認番号 2021001R4)。

使用薬物: Butonitazene を使用した (Fig.1)。

選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬 (E)-4-[[5 α ,6 β]-17-Cyclopropylmethyl]-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]amino]-4-oxo-2-butenic acid methyl ester hydrochloride (β -FNA, Tocris Bioscience)、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone (Sigma-Aldrich)、ドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 (Sigma-Aldrich)、ドパミン D2 受容体拮抗薬 raclopride (Sigma-Aldrich) を使用した。

1. 新規オピオイド化合物のオピオイド受容体作用

Chinese Hamster Ovary (CHO) チャイニーズハムスター卵巣細胞にヒト-オピオイド μ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO- μ 細胞を樹立した。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 (Greiner) に 5×10^4 cells/well となるように播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 (Molecular Devices) を 1 時間取り込ませ、新規オピオイド化合物 butonitazene 添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。データは蛍光強度 (Relative Fluorescence Units, RFU) として解析した。

2. 新規オピオイド化合物による運動活性への影響

Butonitazene により誘発される運動活性を、自発運動量測定装置 (ACTIMO-100, バイオリサーチセンター社) を用いて測定した。3 時間の環境適応後、薬物投与から 120 分間にわたって運動量を測定した。

Butonitazene により誘発される行動変化に対するオピオイド受容体拮抗薬 naloxone 前処置 (薬物投与の 30 分前投与) の効果を検討した。また、butonitazene により誘発される行動変化に対するドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬 raclopride 前処置 (薬物投与の 30 分前投与) の効果を検討した。

3. 新規オピオイド化合物の精神依存性評価

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、1 日に 1 回条件付けを 6 日間にわたって行った。Butonitazene または生理食塩液 (SAL) を投与し、30 分間装置内に閉じ込め、翌日は、薬物を経験した動物に SAL を投与し、そうでない動物は薬物を投与し 30 分間装置内に閉じ込めた (Table 1)。

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。

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 (午前)	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒 (午後)	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎: 薬物、○: 溶媒、T: テスト (薬物、溶媒ともに投与せず)

4. ドパミン遊離に対する影響

三種混合麻酔 (メデトミジン 0.4 mg/kg 、ミダゾラム 2 mg/kg 、ブトルファノール 2.5 mg/kg) による麻酔下で、マウスを脳固定装置 (Narishige, Co.) に固定し、中脳辺縁ドパミン神経系の主要

投射先である側坐核 (from bregma: anterior, +15 mm; lateral, -0.9 mm; ventral, -4.9 mm)をターゲットとして、透析用プローブ (Eicom, Co., D-I-6-01)を外科的に植込み、歯科用セメントにて頭蓋に留置した。手術終了 24 時間後、プローブ内人工脳脊髄液 (147.0 mM NaCl, 4 mM KCl and 1.2 mM CaCl₂, 0.9 mM MgCl₂)で 2 μL/min の流速により灌流した。微量生体試料分析システム HTEC 500 (Eicom, Co.)を用いて、透析液中のドパミン濃度を 20 分間隔で測定した。Butonitazene 投与による影響を検討した。

5. 細胞毒性の評価

胎生 15 日目の新生胎児より forebrain を切り出し氷冷した Dulbecco's modified Eagle's medium (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, 2 mM 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 (Greiner)に 5.0×10^4 cells/well で撒き、37°C・5.0% CO₂ 条件下で 2 日間培養した。MACS Neuro Medium (with 10 μM cytosine arabinoside, NeuroBrew-21, 2 mM L-glutamine)に置換して 24 時間培養した。Cytosine arabinoside 含有 MACS Neuro Medium 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。Butonitazene を無血清 MACS Neuro Medium に最終濃度 31.25-500 μM となるように調製し forebrain 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. 新規オピオイド化合物のオピオイド受容体作用

CHO-μ 細胞を利用して、butonitazene の μ 受容体作用を解析した。CHO-μ 細胞において butonitazene および対照薬として麻薬である isotonitazene と morphine の刺激により有意な蛍光量の増加が確認された。Butonitazene、isotonitazene および morphine の EC₅₀ は、それぞれ 1.167×10^{-8} M、 5.739×10^{-9} M、 3.901×10^{-7} M であった (Fig.2A)。Butonitazene (0.1 μM)、isotonitazene (0.1 μM) および morphine (10 μM) による蛍光強度の増加作用は、選択的 μ オピオイド受容体拮抗薬 β-FNA (5 μM) の前処置により完全に抑制された (Fig.2B)。Butonitazene は、isotonitazene や morphine と同様にオピオイド μ 受容体を介して薬理作用を示すことが明らかになった。

2. 新規オピオイド化合物による運動活性への影響

Butonitazene (5 mg/kg, i.p.)によって、運動促進作用が発現し、中枢作用を有することが明らかになった (Fig. 3AB)。Butonitazene (5 mg/kg, i.p.) の効果は、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone (3 mg/kg, i.p.)の前処置により抑制された (Fig. 4A)。同様に、butonitazene (5 mg/kg, i.p.)によって誘発される運動促進作用はドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 およびドパミン D2 受容体拮抗薬 raclopride の前処置により有意に抑制された (Fig. 4B)。

3. 新規オピオイド化合物の精神依存性評価

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。Butonitazene (5 mg/kg, i.p.)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. 5)。

4. 新規オピオイド化合物のドパミン遊離作用

Butonitazene の中枢興奮作用用量を参考に、マイクロダイヤリシス法により、ドパミン遊離に対する影響を検討した。Butonitazene (5 mg/kg,

i.p.)によって、側坐核において有意なドパミン遊離の増加が確認された (Fig. 6)。

5. Butonitazene の細胞毒性の評価

Butonitazene および morphine 処理 24 時間後に forebrain の初代培養神経細胞の細胞生存率を評価した。医療用麻薬である morphine では細胞生存率に影響は認められなかったが、危険ドラッグである butonitazene は、濃度依存的に細胞生存率の低下を示した (Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、butonitazene のオピオイド受容体作用、中枢作用、精神依存性および細胞毒性に関する評価を行った。

細胞実験では、オピオイド μ 受容体をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO- μ 細胞を樹立し、薬理的解析に利用した。蛍光発光の検出により、butonitazene は、オピオイド μ 受容体作用薬であることを確認した。

次に、butonitazene の行動薬理学特性を解析した。Butonitazene の投与により、運動促進作用が発現し、中枢作用を有することが明らかになった。この効果は、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone によって抑制されることから、butonitazene の中枢作用は、オピオイド受容体を介して発現することが確認された。また、butonitazene の運動促進作用は、ドパミン D1 受容体拮抗薬およびドパミン D2 受容体拮抗薬の前処置により抑制された。これらの結果から、butonitazene の中枢作用の発現には、ドパミン神経系が関与しており、ドパミン D1 受容体およびドパミン D2 受容体の双方の関与が示唆された。

Butonitazene の精神依存形成能を、conditioned place preference (CPP) 法により評価した。Butonitazene 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、butonitazene は精神依存形成能を有することが示唆された。

依存性薬物による精神依存形成および中枢興奮作用の発現には中脳辺縁系ドパミン神経

系の関与が示唆されている。現在までに、フェンタニルはオピオイド μ 受容体に結合し、側坐核においてドパミン遊離量の増加を引き起こすことが報告されている^{6,7)}。こうした薬理学的特性に基づいて、側坐核においてドパミン遊離量の増加が発現したことで、中枢興奮作用および精神依存が発現したものと考えられる。また、butonitazene は、濃度依存的に細胞生存率の低下を示すことから、乱用による有害作用の発現が危惧される。イタリアでは、死亡事例から butonitazene が検出されたケースが報告されている⁸⁾。オーストラリアでは、butonitazene を含む合剤を服用後、ナロキソンで治療を受けた症例が報告されている⁹⁾。アメリカでも、死亡事例から検出されており、butonitazene を含む nitazene 系化合物は公衆衛生上の脅威となっている¹⁰⁾。

本研究の評価結果により butonitazene は強力な中枢作用と精神依存形成能を有することから、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

本研究から、新規オピオイド化合物である butonitazene は中枢興奮作用および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. 引用文献

- 1) Rudd RA, Puja S, Felicita D, Scholl L. Increases in drug and opioid- involved overdose deaths - United States, 2010-2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 65: 1445-1452, 2016.
- 2) Young MM, Pirie T, Buxton JA, Hosein SF. The Rise of Overdose Deaths Involving Fentanyl and the Value of Early Warning. Canadian Journal of Addiction.

6: 13-17, 2015.

3) Krotulski AJ, Papsun DM, Walton SE, Logan BK. Metonitazene in the United States-Forensic toxicology assessment of a potent new synthetic opioid using liquid chromatography mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 13: 1697-1711, 2021.

4) Verougstraete N, Vandeputte MM, Lyphout C, Cannaeert A, Hulpia F, Van Calenbergh S, Verstraete AG, Stove C. First Report on Brorphine: The Next Opioid on the Deadly New Psychoactive Substance Horizon? *J Anal Toxicol.* 44: 937-946, 2021.

5) SE Walton, AJ Krotulski, BK Logan. A Forward-Thinking Approach to Addressing the New Synthetic Opioid 2-Benzylbenzimidazole Nitazene Analogs by Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry (LC-QQQ-MS). *J Anal Toxicol.* 246: 221-231, 2022.

6) Yoshida Y, Koide S, Hirose N, Takada K, Tomiyama K, Koshikawa N, Cools AR. Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. *Neuroscience.* 92: 1357-1365, 1999.

7) Di Chiara G, Imperato A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 244: 1067-1080, 1988.

8) Montanari E, Madeo G, Pichini S, Busardò FP, Carlier J. Acute Intoxications and Fatalities Associated With Benzimidazole Opioid (Nitazene Analog) Use: A Systematic Review. *Ther Drug Monit.* 244: 494-510, 2022.

9) Schumann JL, Syrjanen R, Alford K, Mashetty S, Castle JW, Rotella J, Maplesden J, Greene SL. Intoxications in an Australian Emergency Department Involving 'Nitazene' Benzylbenzimidazole Synthetic Opioids (Etodesnitazene, Butonitazene and Butonitazene). *J Anal Toxicol.* 2022 Aug 19:bkac062. doi: 10.1093/jat/bkac062.

10) Walton SE, Krotulski AJ, Logan BK. A Forward-Thinking Approach to Addressing the New Synthetic Opioid 2-Benzylbenzimidazole Nitazene Analogs by Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry (LC-QQQ-MS). *J Anal Toxicol.* 46: 221-231, 2022.

G. 研究発表

- 1) 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用の評価と包括規制に関する研究. 第53回日本神経精神薬理学会年会 シンポジウム (東京、2023年7月21日)
- 2) 船田正彦. 米国におけるオピオイド乱用・依存問題の現状. 2023年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (岡山、2023年10月14日)
- 3) Tsukasa Tomizawa, Shuntaro Kikukawa, Hironobu Arita, Kayo Nakamura, Kosho Makino, Hidetsugu Tabata, Tetsuta Oshitari, Hideaki Natsugari, Masahiko Funada, Hideyo Takahashi. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Opioid μ -Receptor Antagonists

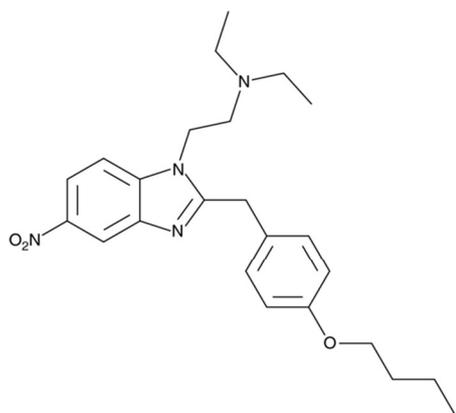
The 11th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference (in Macao) Aug. 2023.

- 4) 菊川俊太郎、有田浩暢、富澤宰、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、舩田正彦、富山健一、高橋秀依「フェンタニル骨格に由来する新規オピオイド μ 受容体アンタゴニストの創製」第 84 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(東京、2023 年 5 月)
- 5) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、舩田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の構造活性相関」日本薬学会 第 143 年会 (札幌、2023 年 3 月)
- 6) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、舩田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の合成と構造活性相関」第 66 回日本薬学会関東支部大会 (横浜、2022 年 9 月)

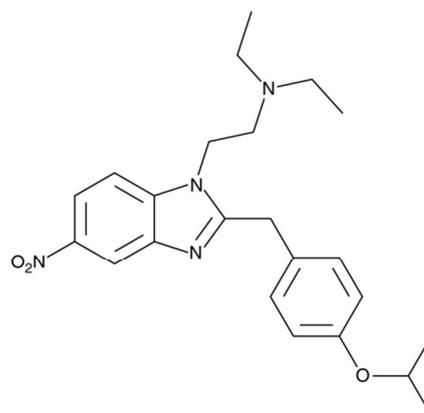
H. 知的財産権の出願・登録状況

健康危険情報

本事業成果は、指定薬物の精神依存性および細胞毒性に関する評価解析であり、結果はすべて健康危険情報に該当する。

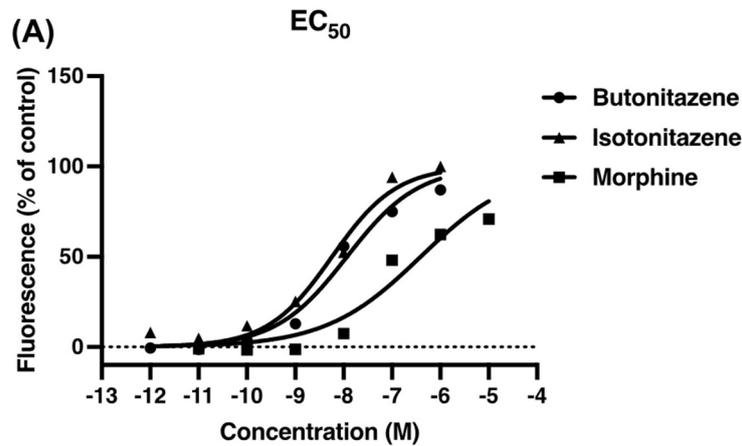


Butonitazene



Isotonitazene (麻藥)

Fig. 1. Chemical structures of butonitazene and isotonitazene.



	Butonitazene	Isotonitazene	Morphine
EC_{50}	1.167e-008	5.739e-009	3.901e-007

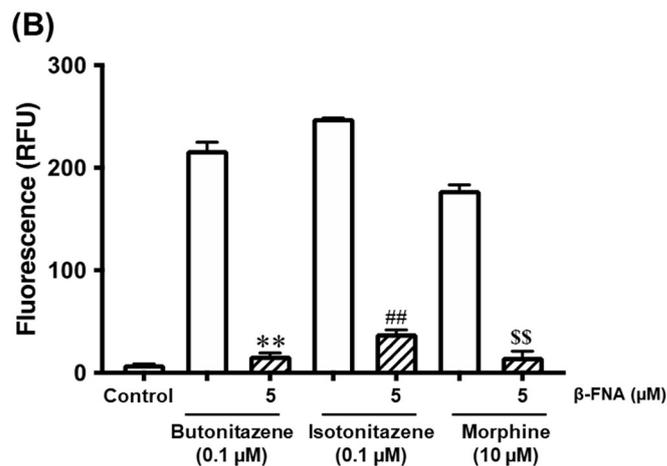


Fig. 2. Analysis of the opioid receptor action of butonitazene

(A) Effect of treatment with butonitazene, isotonitazene or morphine on calcium signal in cloned human μ opioid receptors expressed CHO cells. Changes in intracellular Ca^{2+} levels were detected as changes in fluorescence in the Flexstation II. Each plot represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. The effective concentration 50% (EC_{50}) values calculated using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). (B) Effect of pretreatment with μ opioid receptor antagonist β -funaltrexamine (β -FNA) on butonitazene, isotonitazene or morphine-induced elevation of intracellular Ca^{2+} levels in CHO- μ cells. Changes in intracellular Ca^{2+} levels were detected as changes in fluorescence in the Flexstation II. Each column represents the mean with S.E.M. of three independent experiments. Results were expressed in relative fluorescence units (RFU). ** $p < 0.01$ vs. butonitazene-treated groups. ## $p < 0.01$ vs. isotonitazene-treated groups. \$\$ $p < 0.01$ vs. morphine-treated groups.

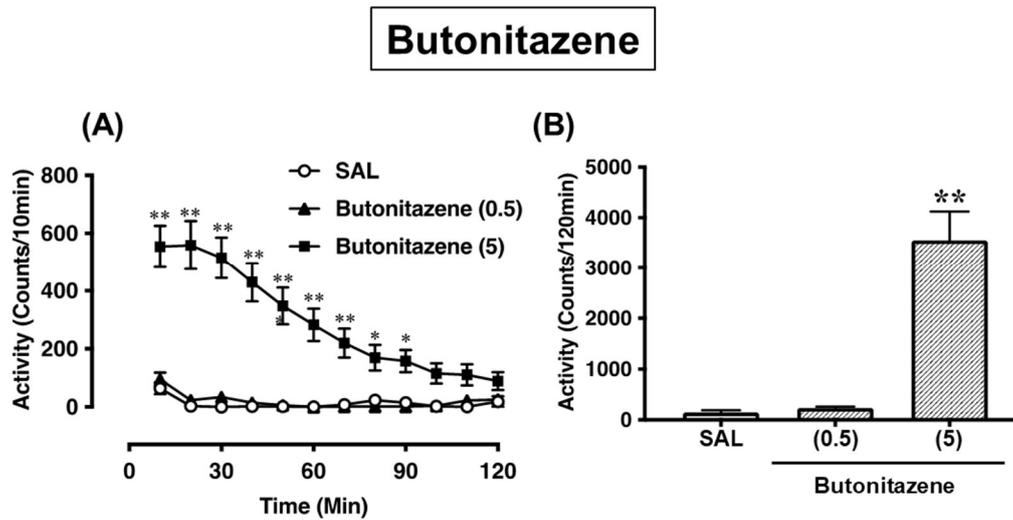


Fig. 3. Effect of butonitazene on locomotor activity in mice

Effect of acute treatment with butonitazene on the locomotor activity in mice. (A) Time course changes after acute administration of butonitazene (0.5 or 5 mg/kg, i.p.)-induced hyperlocomotion in mice. Each point represents the mean activity counts with S.E.M. for 10 min (n=16). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, saline (SAL)-treated group versus (vs) butonitazene-treated group for individual time points, two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. (B) Total locomotor activity changes after acute administration of butonitazene (0.5 or 5 mg/kg, i.p.)-treated in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 120 min (n=16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. ** $p < 0.01$ vs. SAL-treated group.

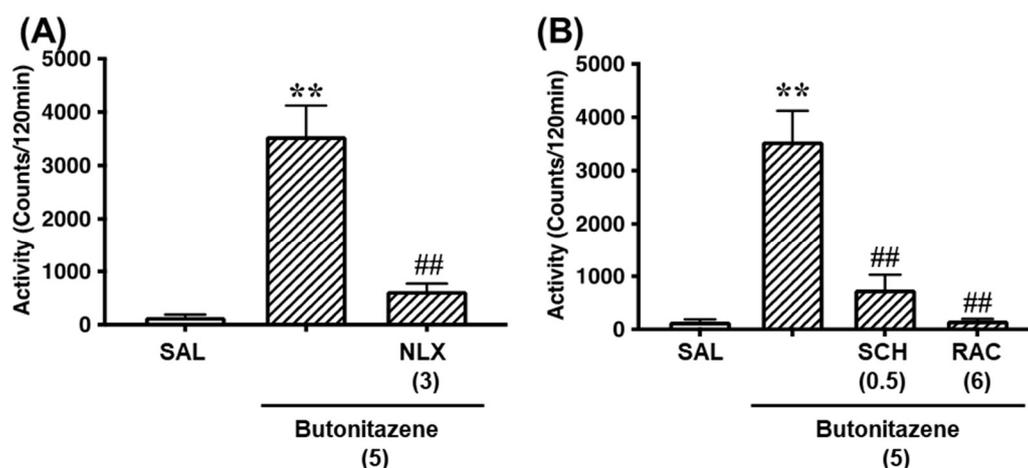


Fig. 4. Pharmacological properties of butonitazene in expression of hyperlocomotion in mice

(A) Effect of pretreatment with an intraperitoneal injection of an opioid receptor antagonist naloxone (NLX, 3 mg/kg, pre 30 min) on the butonitazene (5 mg/kg, i.p.)-induced hyperlocomotion in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 10 min (n=16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. ** $p < 0.01$ vs. SAL-treated group. ## $p < 0.01$ vs. butonitazene-treated group.

(B) Effect of pretreatment with an intraperitoneal injection of a dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 (SCH, 0.5 mg/kg, pre 30 min) or a dopamine D2 receptor antagonist raclopride (RAC, 6 mg/kg, pre 30 min) on the butonitazene (5 mg/kg, i.p.)-induced hyperlocomotion in mice. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. for 10 min (n=16). Dunnet's posttest was also applied on each graph. ** $p < 0.01$ vs. SAL-treated group. ## $p < 0.01$ vs. butonitazene-treated group.

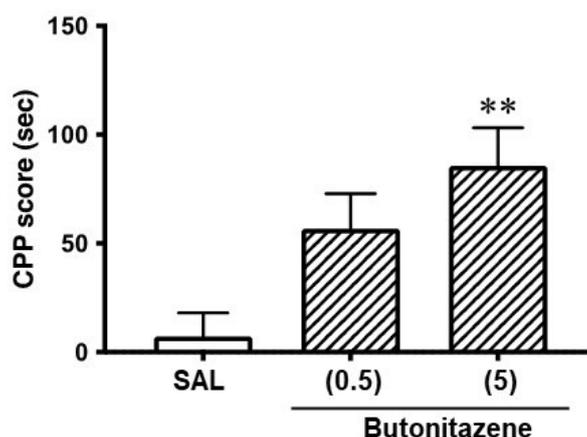


Fig. 5. Place conditioning produced by butonitazene in mice

Effects of new psychoactive substances on place conditioning in mice. Place conditioning produced by butonitazene (0.5 and 5 mg/kg, i.p.). Conditioning sessions (3 for drug; 3 for saline) 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 saline-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 12 animals. ** $p < 0.01$ vs. saline (SAL)-treated group.

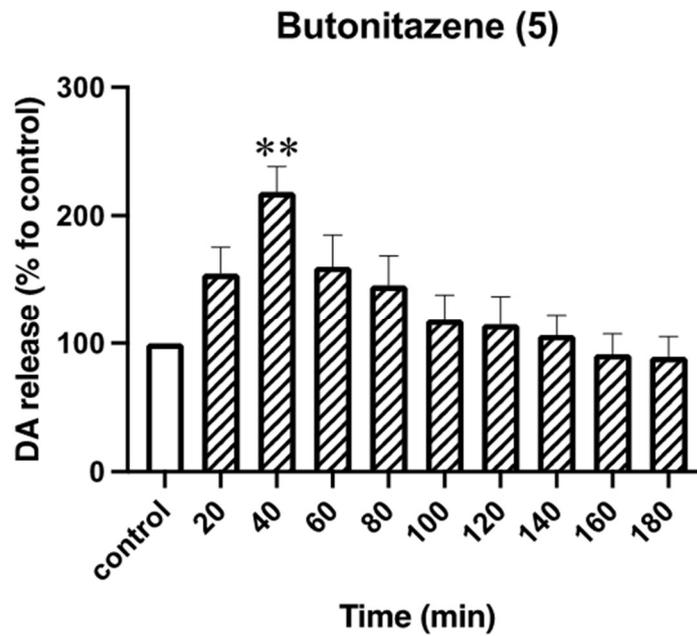


Fig. 6. Effect of butonitazene on dopamine release in the nucleus accumbens
 Effects of treatment with butonitazene on the dialysate dopamine level in the nucleus accumbens.
 Butonitazene (5 mg/kg, i.p.) was injected at time 0. The data are expressed as percentages of the
 corresponding baseline levels with S.E.M of 6 mice. Dunnet's posttest was also applied on each graph.
 ** $p < 0.01$ vs. basal levels.

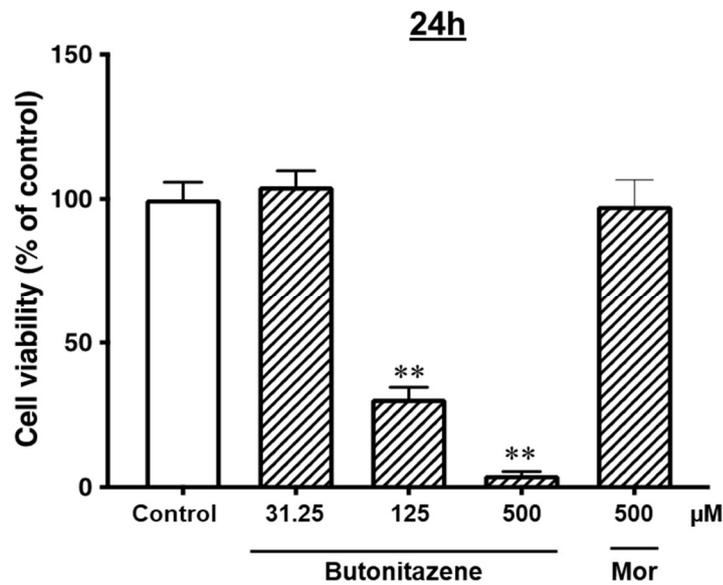


Fig. 7. Evaluation of cytotoxicity for butonitazene

Cell viability in forebrain cultures after treatment with butonitazene or morphine (Mor). The relative value of cell viability compared to the baseline value for control and forebrain cultures treated with butonitazene (31.25-500 μM) and Mor (500 μM) for 24 h. Mean percent changes ± 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 from that observed in controls at the 24 h time point. ** $p < 0.01$ vs. control.

分担研究報告書

危険ドラッグと関連代謝物のインシリコによる活性予測法の開発

分担研究者：栗原正明 (湘南医療大学 薬学部)

協力研究者：市丸 嘉 (湘南医療大学 薬学部)

【研究要旨】

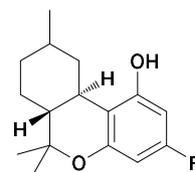
[緒言] 危険ドラッグ及び関連化合物の速やかな規制のために、それらの迅速な評価法開発が求められる。その目的においてインシリコ活性予測法は有効な評価法のひとつになり得ると考えられる。本研究では、コンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を用いて危険ドラッグの活性予測を行い、危険ドラッグの規制、特に包括指定の範囲を決める等のデータを供するための新規評価法の開発を行うことを目的とする。

[結果] HHC 類縁体の活性予測を行った。活性既知のカンナビノイド (THC: tetrahydrocannabinol 類縁体) を用いて QSAR (定量的構造活性相関) 解析を行った。作成した QSAR 式を用いて活性が未知の HHC 類縁体の活性予測を行った。

[考察] 良好な QSAR 式を得ることができた。($R^2=0.979$) 得られた QSAR 式を用いて HHC 類縁体 6 種の活性予測を行った。

A. 研究目的

危険ドラッグが依然として大きな社会問題となっている。それに伴い、危険ドラッグの速やかな規制が求められており、そのための迅速な評価法開発が急務となっている。迅速な評価法構築を支援するツールとして、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。HHC 類縁体の包括規制を見据えた、カンナビノイド類縁体 (Fig. 1) の QSAR (定量的構造活性相関) 解析を行うことを目的とした。



HHC 類縁体 ($R=C_3\sim C_8$)

Fig. 1

B. 研究方法

文献既知のカンナビノイド類縁体のうち側鎖の炭素鎖が異なる化合物 14 個 (Table 1) を母集団とし、統合計算化学システム MOE に搭載された AutoQSAR を用いて QSAR 式を作成した。

C. 研究結果

MOE を用いて作成した良好な QSAR 式を下に示した。

$$\begin{aligned} \text{pKi} = & \\ & -2.249525 \\ & +0.0092104 * \text{PEOE_VSA}+2 \\ & +0.059427 * \text{SMR_VSA}5 \\ & +0.074415 * \text{SlogP_VSA}7 \\ & +0.069448 * \text{SlogP_VSA}8 \end{aligned}$$

$$R^2 = 0.979$$

PEOE_VSA+2、SMR_VSA5、SlogP_VSA7、SlogP_VSA8 は MOE の記述子である。式のグラフを Fig. 2 に示した。

この QSAR 式を用いて、活性未知の HHC 類縁体 (HHCV, HHCB, HHC, HHCH, HHCP, HHCjd) の活性を予測した。(Table 2)

D. 考察

記述子を 4 つ用いた良好な QSAR 式を得ることができた。(R² = 0.979)

得られた QSAR 式を用いて HHC 類縁体 (HHCV, HHCB, HHC, HHCH, HHCP, HHCjd) の活性予測を行った。(Table 2)

E. 結論

活性が既知のカンナビノイド類縁体のうち側鎖の炭素鎖が異なる化合物 14 個を母集団とし、MOE に搭載された AutoQSAR を用いて QSAR 式を作成した。作成した QSAR 式を用いて HHC 類縁体の 6 化合物のマトリックスを作った。これにより HHC 類縁体の総括規制に供するデータとなると考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriya S, Funaki K, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.: Synthesis and properties of PNA containing a dicationic nucleobase based on N4-benzoylated cytosine.: *Bioorg Med Chem Lett.* 2023 May 15;88:129287.
- 2) Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.: Bis(nitrato-κO)(1,4,8,11-tetraaza-cyclo-tetra-decane-κ4 N)zinc(II) methanol monosolvate.: *IUCrdata.* 2022 Aug 31;7(Pt 8):x220854.
- 3) Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T: PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA: *Peptide Science* 2021, 2022, 111-112

2. 学会発表

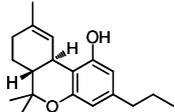
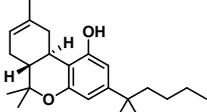
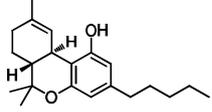
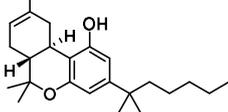
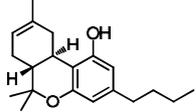
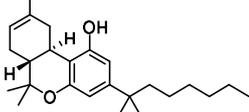
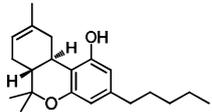
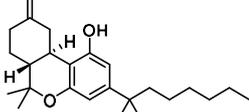
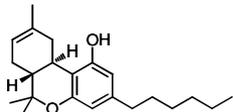
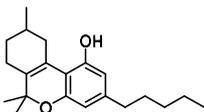
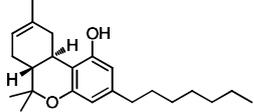
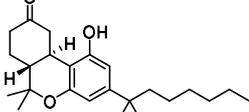
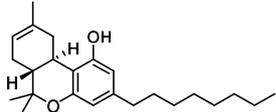
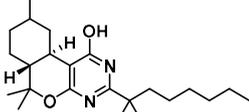
- 1) 大環状ポリアミン-亜鉛錯体の単結晶 X 線結晶構造解析：市丸 嘉、加藤 紘一、小池 透、黒崎 博雅、栗原 正明：日本薬学会第 143 年会 (2023/03)
- 2) 市丸嘉、加藤紘一、栗原正明、黒崎博雅：アントラセンを導入した Bis(2-picoly)amine 誘導体-亜鉛錯体の DNA 光切断活性：第 67 回日本薬学会関東支部大会 (2023/9/16, 東京)
- 3) Shun-suke Moriya, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Strand invasion by PNA containing preQ1: 第 50 回国際核酸化学シンポジウム (2023/11/1-3) 宮崎
- 4) Shun-suke Moriya, Mai Kiyosue, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Properties of peptide nucleic acid containing n4 -bis(aminomethyl)-benzoylated cytosine for enhanced DNA binding: 第 60 回ペプチド討論会

(2023/11/8-10) 滋賀

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

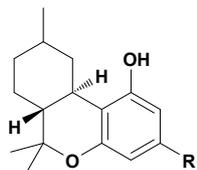
Table 1 文献既知のカンナビノイド類縁体

	類縁体	Ki (nM)	pKi		類縁体	Ki (nM)	pKi
1		75.4	-1.8774	8		3.9	-0.9911
2		40	-1.6021	9		2.7	-0.4314
3		65	-1.8129	10		0.83	0.0809
4		45	-1.6532	11		1.83	-0.2601
5		41	-1.6128	12		29	-1.4624
6		22	-1.3424	13		333	-2.5224
7		8.5	-0.9294	14		55	-1.7404

1) *Perspect Medicin Chem*, 2016, 8, 17-39

2) *J Med Chem*, 2010, 53, 6996-7010

Table 2 QSAR を用いた活性未知の HHC 類縁体の予測活性値



R	C ₃ H ₇	C ₄ H ₉	C ₅ H ₁₁	C ₆ H ₁₃	C ₇ H ₁₅	C ₈ H ₁₇
	HHCV	HHCB	HHC	HHCH	HHCP	HHCjd
予測 Ki 値	122	79	51	33	21	14

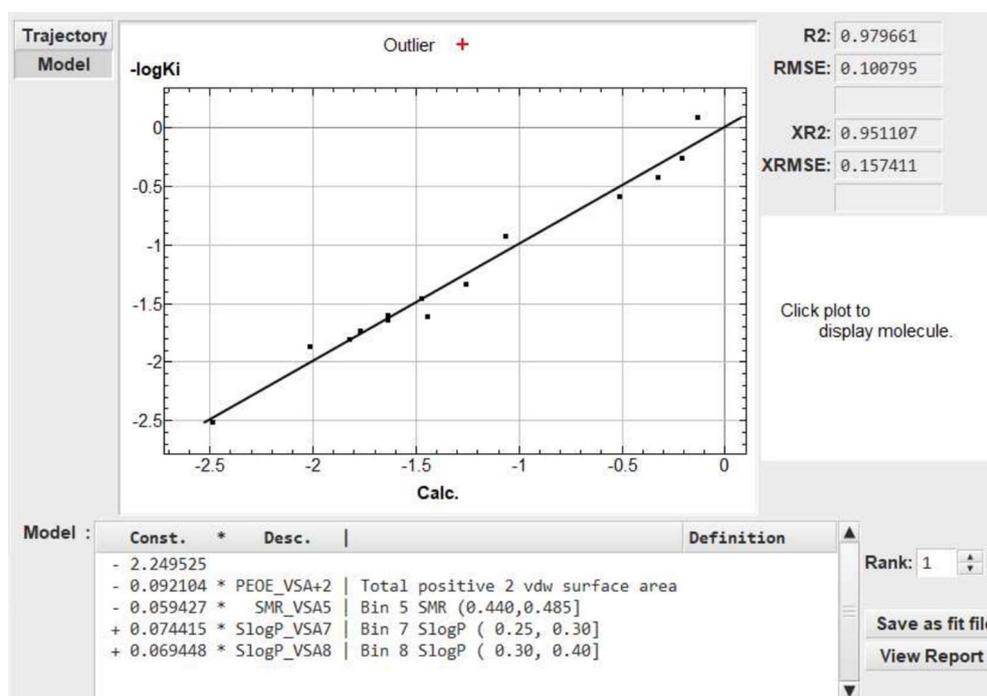


Fig 2 QSAR 解析

令和5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)
危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究(21KC1003)

分担研究報告書

危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる

標的生体分子系の探索研究-3

～モノアミントランスポーターを標的とした

有害性スクリーニングの検討3～

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機構学 講師）

【研究要旨】

[緒言] ドパミン・セロトニントランスポーター(DAT・SERT)への直接作用が危険ドラッグ/乱用薬物の神経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられたので、これまで2年度にわたり、培養細胞を用いた検討を行ってきた。ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーでのアッセイ系を構築することができ、いくつかのフェネチルアミン系、ピペラジン系のドラッグが DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。一方、非細胞 *in vitro* 評価系を確立するためには、DAT 蛋白のみならず連関蛋白の存在が重要と考えられる。そこで今年度は、脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。

[結果と考察] マウス線条体の粗膜分画に DAtracer を反応させ、クリック反応による蛍光標識を行ったところ、DAtracer の DAT への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた。また、フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これら危険ドラッグ/乱用薬物の DAT あるいはドパミンレセプターへの競合拮抗と考えられる作用は、昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーの結果と 4FMP を除いて同様の結果であった。用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。

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⁾⁴⁾。

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求められている。

平成 15 年度から平成 26 年度まで、ドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞 B65 細胞を用いて、のちに麻薬指定されたものも含む以下の危険ドラッグの神経毒性および毒性構造関連について検討してきた¹⁾¹⁴⁾。植物由来催幻覚物質：harmaline, harmine, インドールアルカロイド系: 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT), N-isopropyl-5-methoxy-N-methyltryptamine (5MeO-MIPT), 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeO-DMT), 5-methoxy-N,N-diallyltryptamine (5MeO-DALT), フェネチルアミン系: methylone (メチロン), 4-fluoroamphetamine (4FMP), 4-methoxymethamphetamine (PMMA), 「2C シリーズ」 2,5-dimethoxy-4-propyl thiophenethylamine (2CT-7), 2,5-dimethoxy-4-isopropylthiophenethylamine (2CT-4), 2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenethylamine (2CT-2), 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I), 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C), trichloro-2C-H (T-2C-H), ピペラジン系: phenylpiperazine (PP), 1-(2-chlorophenyl)-piperazine (2CPP), 1-(4-chlorophenyl)-piperazine (4CPP), 1-(4-methoxyphenyl)-piperazine (4MPP), カチノン系: ethcathinone (エトカチノン), 2-fluorocathinone (2-FCAT), 3-fluorocathinone (3-FCAT), 4-fluorocathinone (4-FCAT)。その結果、harmaline, harmine が比較的低濃度でアポトーシス様細胞死を惹起しうること^{2,3)}、MDMA や覚せい剤 methamphetamine (METH)の構造類似体の methylone, 4FMP, PMMA が、低濃度から

MDMA もしくは METH との同時併用により、ドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を惹起すること^{3,4,6)}、ピペラジン系 PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP は、ドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対して、極めて強い神経毒性を惹起することを明らかにした⁷⁾。フェネチルアミン系「2C シリーズ」 2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H が単独でドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞において MDMA や METH よりもはるかに強い神経毒性をもたらすことを示し、「2C シリーズ」の共通骨格が、単独でドパミン系神経細胞ならびにセロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を示すこと、2,5 位に dimethoxy 基を有する共通骨格によりドパミン系・セロトニン系神経細胞に対して、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い毒性を発揮することを明らかにした^{5,8-10,13,14)}。5MeO-DIPT のインドール骨格に加え側鎖の diisopropyl 基が強い神経細胞毒性を惹起する可能性があることを示し¹¹⁾、カチノン骨格の神経毒性は弱い¹¹⁾が、そのベンゼン環の修飾はさらにドパミン神経細胞毒性を低下させることも明らかにした^{11,12)}。

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⁷⁾¹⁴⁾。

平成 27 年度から平成 29 年度には、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 monoamine oxidase (MAO)の阻害活性について、発光性 MAO 基質による MAO 活性の発光検出システムを用いて検討し、フェネチルアミン系、ピペラジン系、インドー

ルアルカロイド系などの粉末・顆粒状乱用ドラッグの水溶液およびアロマオイルに混じた乱用ドラッグの MAO 阻害活性を高感度で検出できること、小型キット化すれば簡便なスクリーニング法になりうることを明らかにした¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

平成 30 年度、令和元年度は、組織損傷に応じて細胞外へ放出され炎症惹起に働く damage-associated molecular patterns (DAMPs)であり、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発現が誘導され、中和抗体投与により神経障害が有意に抑制される¹⁸⁾ことが報告されている核内 DNA 結合タンパク質 High mobility group box-1 (HMGB1)に着目し、METH 急性投与神経毒性モデルマウスでの HMGB1 血中濃度の上昇と神経細胞での核外移行、高体温、ドパミン神経終末の脱落が、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与により有意に抑制できること¹⁹⁾、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)のモノアミン系培養神経細胞への曝露早期における HMGB1 の核外移行と神経細胞障害性が、2CT-7を除いて相関しており、HMGB1 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こと²⁰⁾を明らかにした。さらに令和 2 年度には、HMGB1 の核外移行だけでなく、細胞内でのスーパーオキシドなど活性酸素種生成など複数の早期神経障害指標を用いて神経毒性発現の蓋然性をスクリーニングすることが望ましいことを提唱した²¹⁾。

このようなドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞 B65 細胞を用いた危険ドラッグおよび類似関連化合物の神経毒性および毒性構造相関、神経炎症や酸化ストレスの誘導性についての検討結果¹⁾⁻¹⁴⁾から、神経細胞のモノアミントランスポーター、すなわちドパミントランスポーター(DAT)あるいはセロトニントランスポーター(SERT)への直接作用が神経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられた。そこ

で、モノアミントランスポーターの DAT や SERT を強制発現している細胞を用いることで、より鋭敏に感度よく細胞障害性を評価できないかと考え、令和 3 年度は DAT, SERT を恒常的に発現している chinese hamster ovary (CHO)細胞(CHO-DAT, CHO-SERT)を用いて各種乱用薬物、危険ドラッグ曝露による細胞毒性および形態変化について検討したところ、2CT-7, 2CT-4, 2C-C, harmaline, 5MeO-DMT, 5MeO-MIPT, PP で細胞死およびアポトーシス様の形態変化が認められたが、CATH.a 細胞、B65 細胞に比べ軽度であり、特に METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA などのフェンチルアミン系ドラッグの細胞毒性は、CATH.a 細胞や B65 細胞では顕著であるのに比べ、CHO-DAT 細胞、CHO-SERT 細胞では全く認められなかった²²⁾。これらより、危険ドラッグの細胞毒性発現には神経伝達物質の存在および放出が必要であり、細胞毒性を評価指標にするにはモノアミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもっている培養神経細胞株を用いる必要があると考えられた²²⁾。

昨年度は危険ドラッグ/類似関連化合物の DAT への作用の有無を評価するために、ドパミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもつドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミンおよび危険ドラッグ/乱用薬物を細胞に添加・反応させた後に固定し、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、DAT への競合反応の有無を検出するクリックケミストリーでのアッセイ系を構築することができた²³⁾。methylone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、アルキン化ドパミンの蛍光シグナルが同時添加で抑制され、ドパミンとこれら危険ドラッグ/乱用薬物の DAT への競合拮抗作用を検出した。また、マウス線条体の粗膜分画からの免疫沈降で得られた DAT 蛋白を用いた in vitro 評価系の確立についても試みたが DAT への結合を検出することができなかった。非細胞系において DAT への作用の有無を評価するためには、DAT 蛋白のみならず関連蛋白の存在が重要と考えられた。

そこで、今年度は脳組織粗膜分画に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。

B. 研究方法

クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた危険ドラッグの線条体粗膜分画への作用の評価

マウス線条体組織(約 15 mg)を protease inhibitor 入りの PBS 200 μ l でホモジナイズし、12,000 rpm、20 分間遠沈し、PBS 1 ml で再懸濁させ粗膜分画標品を得た。粗膜分画標品 100 μ l/well をゼラチンコートした 96 穴プレートに添加して 4°C で 30 分間静置した。PBS での洗浄の後、6 種のフェネチルアミン系、ピペラジン系の乱用薬物/危険ドラッグ：METH, MDMA, methylone, 4FMP, PMMA, PP あるいはドパミン(各最終濃度 50 μ M)を添加し、次いで 100 μ M アルキン化ドパミン(DAtracer: 最終濃度 50 μ M)を添加し、37°C で 30 分間反応させた。さらに PBS による洗浄の後、Cu⁺触媒下で蛍光アジド(12.5 μ M Azide fluor 488)とのクリック反応(室温、30 分間)により粗膜分画標品に結合したドパミンを蛍光標識して、PBS による洗浄の後、蛍光強度の測定(ex 488 nm, em を行うことで、標識ドパミンと危険ドラッグ/類似関連化合物の粗膜分画標品への競合反応の有無を評価した。

C. 研究結果

クリック反応でのアルキン化ドパミン標識法を用いた線条体粗膜分画への危険ドラッグの作用の評価

マウス線条体の粗膜分画に DAtracer を反応させ、蛍光アジドとのクリック反応によりドパミンを蛍光標識するクリックケミストリーを行い蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光強度測定を行ったところ、DAtracer (50

μ M)の DAT への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた。

また、DAtracer (50 μ M)とともにフェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物(各最終濃度 50 μ M)の添加を行ったところ、MDMA > METH, PMMA > methylone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された(表 1)。しかし、今回用いた濃度(各最終濃度 50 μ M)では methylone, 4FMP, PP での DAtracer の蛍光シグナルの明らかな抑制は認められなかった。

D. 考察

これまでのドパミン系神経細胞 CATH.a 細胞ならびにセロトニン含有神経細胞 B65 細胞を用いた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、毒性発現のプロファイルならびに構造毒性相関に関する検討結果¹⁾¹⁴⁾から、それぞれの薬剤のモノアミントランスporter(DAT, SERT)への直接作用が神経毒性発現の端緒となっている可能性が考えられたので、これまで2年度にわたり、培養細胞を用いた DAT を標的とした危険ドラッグの有害性スクリーニング方法の確立を試みてきた。特に昨年度は、CATH.a 細胞を用いてアルキン化ドパミンおよび危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応でドパミンを蛍光標識し、DAT への競合反応の有無を蛍光顕微鏡で検出するクリックケミストリーでのアッセイ系を構築することができた²³⁾。methylone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、アルキン化ドパミンの蛍光シグナルが同時添加で抑制され、DAT への競合拮抗作用を有していることを評価できた。この細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーでは、DAT への競合拮抗作用を可視化できるものの、細胞培養の必要があること、定量性が不十分であること、蛍光シグナルの抑制が DAT への競合拮抗作用によるのか強力な細胞毒性・細胞死によるものか判別するのが難しいことなど問題があった。

一方で、迅速に危険ドラッグおよび類似関連化合物の DAT への結合、取り込み活性を評価するためには、培養細胞を用いない非細胞系 in vitro 評価系が有用であると考えられる。非細胞系において DAT への作用の有無を評価するためには、DAT 蛋白のみならず関連蛋白の存在が重要と考えられた。そこで今年度は、脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を in vitro で評価することを試みた。

危険ドラッグ/類似関連化合物の DAT への作用の有無を評価するにあたり、ドパミンの DAT への作用を非 RI により可視化する方法として、蛍光標識ドパミンを細胞膜上の DAT に作用させ方法が考えられるが、分子量の大きい蛍光物質によりドパミンの DAT への結合、取り込みが阻害されてしまう可能性が高い。そこで、昨年度の細胞系での検討²³⁾と同様に、アルキン化ドパミン(DAtracer)を脳組織粗膜分画標品に反応させ DAT に結合させた後に蛍光アジドとのクリック反応によりドパミンを蛍光標識するクリックケミストリーの手法を用いた。まず、マウス線条体の粗膜分画標品に DAtracer を反応させ、クリック反応による蛍光標識を行ったところ、DAtracer の粗膜分画標品への結合と考えられる蛍光シグナルが確認できた(表1)。昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーにおいて、細胞膜上の蛍光陽性シグナルが、濃度依存的に増加し、非標識ドパミンの同時添加により抑制されたことから、アルキン化ドパミン(DAtracer)の DAT (あるいはドパミンレセプター) への作用に対して非標識ドパミンが競合していることを確認している²³⁾。今回の DAtracer の粗膜分画標品への結合についての検討では非修飾ドパミン(50 μM)の同時添加により抑制されなかったが、DAtracer はクロム化されにくいものに対して非修飾ドパミンは容易にクロムへ酸化され赤褐色に着色しているので、粗膜分画標品中に存在するモノアミン酸

化酵素など酸化酵素類によりドパミンが酸化され、DAT (あるいはドパミンレセプター) への結合がみられなくなることを示唆しているのかもしれない。

次に、この脳組織粗膜分画標品へのアルキン化ドパミン(DAtracer)の結合活性をみるクリック反応標識法を用いて、フェネチルアミン系、ピペラジン系の乱用薬物/危険ドラッグの DAT への作用の評価を行ったところ、MDMA > METH, PMMA > methyone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。昨年度の CATH.a 細胞を用いた DAtracer のクリックケミストリーでは、methyone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、アルキン化ドパミンの蛍光シグナルが同時添加で抑制されており²³⁾、4FMP を除いて同様の結果であり、これらの乱用薬物/危険ドラッグが DAtracer の DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗していることを示していると考えられた。今回の脳組織粗膜分画標品へのアルキン化ドパミン(DAtracer)の結合活性をみるクリックケミストリーでは乱用薬物/危険ドラッグの用量依存性については検討できておらず、粗膜分画標品への非特異的結合を抑制することも今後の課題である。また、培養細胞を用いない非細胞系 in vitro 評価系である利点はあるものの、前述したようにドラッグによっては粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響で結合が阻害される可能性も考えられる。

アルキン化物質とアジド化物質とのクリック反応での蛍光標識法は、アルキン化ドパミン(DAtracer)の DAT への取り込み、結合をみるだけでなく、リガンドをアルキン化あるいはアジド化してクリック反応で標識することにより、様々なトランスポーターやレセプターへの薬物の結合活性の評価できる有用なツールとなりうる。カンナビノイド受容体アンタゴニストのアルキン化物質を用いたクリック反応で、合成危険ドラッグのカンナビノイド受容体への結合活性を評価することも可能であろう。

E. 結論

脳組織粗膜分画標品に直接アルキン化ドパミン(DAtracer)および危険ドラッグ/乱用薬物を添加・反応させ、蛍光アジドとのクリック反応により DAT への競合反応を *in vitro* で評価することを試みた。フェネチルアミン系、ピペラジン系の危険ドラッグ/乱用薬物のうち、MDMA > METH, PMMA > methyloone の順で、DAtracer の蛍光シグナルが同時添加で抑制された。これらの危険ドラッグ/乱用薬物がアルキン化ドパミンの DAT あるいはドパミンレセプターに対する作用と競合拮抗していることを示していると考えられる。

用量依存性や非特異的結合の抑制、粗膜分画標品中の酸化酵素類の影響に関する検討は今後の課題となるものの、粗膜分画標品を用いたクリックケミストリーは細胞培養を要さない薬剤の特定神経系への作用評価法として有用となるかもしれない。

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) 船田正彦, 竹林美佳, 宮崎育子, 浅沼幹人, 青尾直也, 和田 清: ハルミンの薬物依存性ならびに細胞毒性の評価: 植物由来催幻覚成分の有害作用について. 精神保健研究, 61(28): 61-72, 2015.
- 4) 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.
- 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 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.
- 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 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Asanuma, M., Miyazaki, I. and Funada, M.: The neurotoxicity of psychoactive phenethylamines "2C series" in cultured monoaminergic neuronal cell lines. *Forensic Toxicol.*, 38: 394-408, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s11419-020-00527-w>
- 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～. 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.

- 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 2～. 令和元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）。2020.
- 21) 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～酸化ストレスマーカー dHEt を指標にして～. 令和2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）。2021.
- 22) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる標的生体分子系の探索研究～モノアミントランスポーターを標的とした有害性スクリーニングの検討～. 令和3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）「危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価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）。2022.
- 23) 浅沼幹人, 宮崎育子: 危険ドラッグおよび関連化合物の有害性発現に関わる標的生体分子系の探索研究-2～モノアミントランスポーターを標的とした有害性スクリーニングの検討2～. 令和4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）「危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価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）。2023.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 4) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Multifunctional Metallothioneins as a Target for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Antioxidants*, 12(4): 894, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12040894>
- 5) Murata, H., Phoo, M.T.Z., Ochi, T., Tomonobu, N., Yamamoto, K., Kinoshita, R., Miyazaki, I., Nishibori, M., Asanuma, M. and Sakaguchi, M.: Phosphorylated SARM1 is involved in the pathological process of rotenone-induced neurodegeneration. *J. Biochem.*, 174(6): 533-548, 2023. doi: 10.1093/jb/mvad068
- 6) Masai, K., Nakayama, Y., Shin, K., Sugahara, C., Miyazaki, I., Yasuhara, T., Date, I. and Asanuma, M.: Neurogenesis impairment with glial activation in the hippocampus-connected regions of intracerebroventricular streptozotocin-injected mice. *Neurosci. Lett.*, 820: 137598, 2024. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137598

2. 学会発表

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子, 進 浩太郎, 都 明希, 小林壯太郎, 津田光希, 小野鈴香, 小川賢透, 正井加織: 脳・腸神経変性を再現できるパーキンソン病モデルにおける腸管バリア機能の破綻, 炎症反応. 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台, 2023.3.18.
- 2) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: 中脳神経細胞における α シヌクレイン発現とロテノン誘発神経障害へのグリア細胞部位特異性の関与. 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会, 仙台, 2023.3.19.
- 3) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Sogawa, C., Sogawa, N., Kitamura, Y. and Asanuma,

- M.: Mesencephalic glia contributes to alpha-synuclein expression and neurotoxicity in parkinsonian model, 第 64 回日本神経学会学術大会, 千葉, 2023.6.1.
- 4) 宮崎育子, 浅沼幹人: 部位特異的アストロサイト-ミクログリア連関がもたらすドパミン神経障害. シンポジウム: ミクログリア毒性学, 第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19.
- 5) 正井加織, 中山裕太, 進浩太郎, 宮崎育子, 浅沼幹人: ストレプトゾトシン脳室内投与孤発性アルツハイマー病モデルマウスにおけるグリア細胞活性化の領域特異性. 第 66 回日本神経化学学会大会, 神戸, 2023.7.6.
- 6) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: ロテノン曝露による中脳神経細胞における α シヌクレイン発現誘導と神経障害へのグリア細胞部位特異性の関与. 第 17 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS(MDSJ), 大阪, 2023.7.21.
- 7) 浅沼幹人: 危険ドラッグの神経細胞毒性発現の蓋然性スクリーニングにむけた標的
- 生体分子系の探索. シンポジウム: 危険ドラッグにおける乱用・流通規制の現状と研究の最前線, 第 53 回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 2023.9.7.
- 8) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: パーキンソン病の環境要因農薬ロテノンによる中脳ドパミン神経障害と α シヌクレイン発現へのグリア部位特異性の関与. 第 53 回日本神経精神薬理学会年会, 東京, 2023.9.7.
- 9) 浅沼幹人, 一瀬愛花, 三澤一華, 小川賢透, 進浩太郎, 宮崎育子: メタロチオネイン発現を誘導するアストロサイトのセロトニン 1A 受容体刺激による神経突起伸長作用の検討. メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜, 2023.10.5-6.

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

表1 線条体組織粗膜分画へのアルキン化ドパミン(DAtracer)の結合活性の蛍光アジドとのクリック反応による評価と各種危険ドラッグ/乱用薬物の拮抗作用

	蛍光強度
Control vehicle	189.30
Dopamine (50 μ M)	187.38
METH (50 μ M)	134.92
MDMA (50 μ M)	108.23
Methylone (50 μ M)	175.14
4FMP (50 μ M)	197.22
PMMA (50 μ M)	135.89
PP (50 μ M)	247.84

令和5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)
危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究(21KC1003)

分担研究報告書

フェンタニル類似体の摂取証明に向けた代謝挙動の研究

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：岩木孝晴 (岐阜県保健環境研究所 生活科学部)
研究協力者：種田靖久 (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：伊藤宏輔 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：岩井康晴 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：安陪晃ノ介 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)
研究協力者：嶋田百伽 (岐阜薬科大学 薬物動態学研究室)

【研究要旨】

[緒言] 近年フェンタニルやフェンタニル類似体の過剰摂取による死亡者数の増加が米国を中心に問題となっている。フェンタニル類似体はフェンタニルと同様に体内で広範な代謝を受けるため、その摂取証明のためには各類似体の代謝プロファイルの解明・蓄積が求められる。そこで本研究ではヒト肝ミクロソームを用いて 3-phenylpropanoylfentanyl (3-PPF) および benzoylfentanyl (BZF) の *in vitro* 代謝挙動の解明を試みた。

[結果] ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験により、半減期は 3-PPF で 7.9 ± 0.5 min、BZF で 85.4 ± 7.2 min と算出された。3-PPF の代謝物として酸化的 *N*-脱アルキル化体 (nor 体) の一水酸化体 P1、nor 体 P2、一水酸化体 P3 が検出された。P3 は反応開始直後から急速に生成されたが、反応開始 20 分以降その検出強度は減衰した。試験終了時 (120 min) においては、P2 が最も高い強度で検出された。BZF の代謝物として nor 体 B1、アミド加水分解体 B2、一水酸化体 B3 が得られ、いずれも緩徐に生成された。試験終了時 (180 min) においては、B1 が最も高い強度で検出された。LCMS-IT-TOF 分析により、両 FAs 代謝物の水酸基の位置を決定することでアミド側鎖の伸長により水酸化反応の反応部位が変化し、より *N*-アシル基で水酸化を受けやすくなることが確認された。よりアミド側鎖の長い 3-PPF は *N*-アシル基の水酸化反応によって速やかに消失することが明らかになった。

[考察] BZF は半減期が長いため、親化合物自身が摂取証明に利用可能であることが示された。一方で 3-PPF の半減期は極めて短く、親化合物の検出は摂取証明に適さないことが示唆された。摂取証明のためのバイオマーカーとしては、3-PPF では nor 代謝物が、BZF では親化合物と nor 代謝物が利用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

フェンタニル類似体 (fentanyl analogs, FAs) は、フェンタニルの構造の一部を変化させた新

規精神活性物質¹⁾ (novel psychoactive substances, NPS) の一種であり、世界各地で多くの健康問題・社会問題を引き起こしている^{2,3)}。また、近年米国をはじめとしてオピオイドの乱用が問

題視されており、フェンタニルや FAs の過剰摂取による死亡者数が急激に増加している⁴⁾。

FAs を含む乱用薬物の摂取を証明するため、法医学や臨床毒物学の分野ではしばしば尿が検体として用いられるが、フェンタニルの未変化体の尿中排泄率は低く⁵⁾、FAs の多くは CYP3A4 をはじめとする代謝酵素によって広範囲に代謝され、尿中から親化合物の未変化体が検出されにくい^{6,7)}。そのため、摂取された化合物を特定するためには各 FA についての代謝プロファイルの蓄積が重要となる。乱用薬物のヒト尿サンプルを入手することは困難であるため、その代謝プロファイルを調べる方法としてヒト肝ミクロソーム (hLMs) やヒト肝細胞 (hHEP) を用いた *in vitro* 実験が広く行われている⁸⁾。

3-Phenylpropanoylfentanyl [N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidyl]-3-phenylpropan amide or 3-PPF] および benzoylfentanyl [N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)-4-piperidyl]benzamide or BZF] は 2017 年に初めて押収された FAs であり、それぞれ N-アシル基として phenylethyl および phenyl 構造を有する化合物である。3-PPF の *in vitro* 代謝プロファイルについては 2023 年に Rautio ら⁹⁾が、BZF の *in vitro* 代謝は 2021 年に Trana ら¹⁰⁾がそれぞれ hHEP を用いて報告しているものの、これら 2 つの FAs の代謝挙動を直接比較した報告は調べた限りではまだない。

そこで、本研究では、3-PPF および BZF の摂取を証明するためのバイオマーカーを特定するとともに、FAs の N-アシル基の炭素数と水酸化代謝反応の間の関係を確認することを目的として、hLMs を用いた代謝挙動の解明および比較を行った。

B. 研究方法

1. ヒト肝ミクロソーム (hLMs) を用いた 3-PPF、BZF の代謝反応およびサンプル調製

In vitro 代謝反応は Erratico ら¹¹⁾、首村ら¹²⁾の方法に一部改良を加えて行った。サンプル採取は hLMs 溶液を添加後、3-PPF では 0、10、20、

30、60、90 および 120 min に、BZF では 0、10、20、30、60、90、120 および 180 min に行った。反応溶液を氷冷 acetonitrile に添加することで代謝反応を停止させ、この溶液を遠心分離し得た上清を遠心乾固した。LC-MS/MS および LCMS-IT-TOF を用いた分析には、遠心乾固したサンプルに acetonitrile および IS である papaverine を含有する精製水を添加し、超音波処理を行って再溶解させた後、フィルターろ過したものを測定に用いた。

2. LC-MS/MS 分析条件

3-PPF および BZF、またそれらの代謝物の分析には、LCMS-8045 triple quadrupole mass spectrometer (島津製作所, 京都) を用いた。カラムには ZORBAX Eclipse Plus C8 (2.1×150 mm, 3.5 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用した。移動相には、0.1 % formic acid in 精製水および 0.1 % formic acid in acetonitrile を用い、化合物毎に異なるグラジエント条件で測定を行った。3-PPF のグラジエント条件は、0–2 min: 30 %、2–17 min: 30→60 %、17–17.5 min: 60→100 %、17.5–20 min: 100 %、20–20.5 min: 100→30 %、20.5–25 min: 30 %とし、全体としての測定時間は 25 min に設定した。BZF のグラジエント条件は、0–2 min: 10 %、2–17 min: 10→40 %、17–17.5 min: 40→100 %、17.5–20 min: 100 %、20–20.5 min: 100→10 %、20.5–25 min: 10 %とし、全体としての測定時間は 25 min とした。また、3-PPF、BZF とともにカラム温度は 40 °C、流速は 0.25 mL/min とし、インジェクト量は 5 µL とし、測定を行った。イオン化法としては positive electrospray ionization (ESI) mode を用いた。3-PPF と BZF および papaverine の *m/z* 値はそれぞれ 413.26→188.20、385.15→188.20 および 340.15→202.10 とし、コリジョンエネルギー (CE) はそれぞれ 27 V、24 V および 28 V に設定した。

3. LCMS-IT-TOF 分析条件

3-PPF、BZF の代謝物構造解析には、高速液体クロマトグラム (Prominence UFLC system) にイオントラップ型質量分析計 (IT) および飛行

時間型質量分析計 (TOF) を結合させた LCMS-IT-TOF (島津製作所) を用いた。カラムには ZORBAX Eclipse Plus C8 (2.1×150 mm, 3.5 mm) (Agilent Technologies) を使用した。移動相には、(A) 0.1 % formic acid in 精製水および (B) 0.1 % formic acid in acetonitrile を用いた。3-PPF のグラジエントの条件は、(B) 0–2 min: 10 %、2–24 min: 10→70 %、24–24.5 min: 70→100 %、24.5–30 min: 100 %、30–30.5 min: 100→10 %、30.5–40 min: 10 % とし、BZF のグラジエントの条件は、(B) 0–2 min: 10 %、2–24 min: 10→49 %、24–24.5 min: 49→100 %、24.5–30 min: 100 %、30–30.5 min: 100→10 %、30.5–40 min: 10 % とした。全体としての測定時間はいずれも 40 min に設定した。また、カラム温度は 40 °C、流速は 0.18 mL/min、分析装置への注入量は 5 μL として測定を行った。イオン化法として positive/negative ESI mode を用い、マスデータの測定範囲は m/z 100–450 として測定を行った。なお、イオン蓄積時間は 50 msec、auto sensitivity control は 70 % とした。また、collision-induced dissociation (CID) における各プリカーサーイオンの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 50 % に設定し、アルゴンをコリジョンガスに用いた。なお、第 I 相代謝物の検出には positive ESI mode を、第 II 相代謝物の検出には negative ESI mode を用いた。

4. データ解析

得られたピークの m/z を MetID Solution 1.1 (島津製作所) によって予測された候補代謝物の m/z と比較することで代謝物を推定した。測定した代謝物に関しては positive ESI mode における保持時間 (retention time, RT) 順に命名した。代謝物のピークを同定し、それぞれの構造を推定するため、以下の基準を用いた。

- ① 測定された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。
- ② 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。
- ③ ブランクサンプル中の同じ RT に候補代謝物のピークが存在しない。

C. 研究結果

1. *In vitro* 代謝実験における半減期の算出

LC-MS/MS による各 FAs の未変化体の経時変化より、hLMs を用いた *in vitro* 代謝半減期は 3-PPF で 7.9 ± 0.5 min、BZF で 85.4 ± 7.2 min であった (Fig. 1)。

2. *In vitro* 実験における 3-PPF、BZF の主要代謝経路と代謝物経時変化

In vitro 代謝試験における LC-MS/MS 分析によって得られた 3-PPF の *in vitro* 代謝物経時変化を Fig. 2a に、推定された代謝経路を Fig. 3 に示す。3-PPF の代謝物として酸化的 *N*-脱アルキル化体 (nor 体) の一水酸化体 P1、nor 体 P2、一水酸化体 P3 が検出された (Table 1)。P3 は反応開始直後から急速に生成されたが、反応開始 20 分以降その検出強度は減衰した。試験終了時 (120 min) においては、P2 が最も高い強度で検出された (Fig. 2a)。

LC-MS/MS 分析によって得られた BZF の *in vitro* 代謝物経時変化を Fig. 2b に、推定された代謝経路を Fig. 4 に示す。BZF の代謝物として nor 体 B1、アミド加水分解体 B2、一水酸化体 B3 が得られ、いずれも緩徐に生成された。試験終了時 (180 min) においては、B1 が最も高い強度で検出された (Fig. 2b)。

3. LCMS-IT-TOF を用いた両 FAs の代謝物構造解析

LCMS-IT-TOF 分析により、P1、P3 および B3 の構造解析を行った (Table 2, Figs. 5, 6)。また、negative ESI mode 測定において第 II 相代謝物はいずれの FAs でも検出されなかった。

P1 の $[M + H]^+$ 分子イオンを示す m/z 325.1911 の EIC スペクトルには 1 つのピークが検出された (Fig. 5a)。MS² スペクトルから、Fig. 6a に示すように、*N*-アシル基を除いた構造に由来する m/z 203 のプロダクトイオンを生成した。その他のプロダクトイオンはプリカーサーイオンの部分構造として推定できなかった。

P3 の[M + H]⁺分子イオンを示す *m/z* 429.2537 の EIC スペクトルにおいて、主要な 4 つのピークが検出された (Fig. 5b)。溶出順にそれぞれ P3a-d とした。MS² スペクトル解析において P3a および P3c は、未変化の phenethylpiperidine 部分に由来する *m/z* 188 のプロダクトイオン、アミド部分でのフラグメンテーションに対応する *m/z* 281 のプロダクトイオンを生成した。P3b は主に *m/z* 188, 281 のプロダクトイオンに加え、*N*-アシル基側の phenylethyl 基を除いた構造に由来する *m/z* 307 のプロダクトイオンを生成した。P3d は水酸化を受けた phenethylpiperidine 部分に由来する *m/z* 204 のプロダクトイオンを生成した (Fig. 6b-e)。

B3 の[M + H]⁺分子イオンを示す *m/z* 401.2224 の EIC スペクトルには 1 つのピークが検出された (Fig. 5c)。MS² スペクトル解析において、水酸化を受けた phenethylpiperidine 部分に由来する *m/z* 204 のプロダクトイオンを生成した。また、*m/z* 204 のイオンから水が脱離した構造に由来する *m/z* 186 のプロダクトイオンおよび[M + H]⁺分子イオンからの水の脱離を示す *m/z* 383 のプロダクトイオンをそれぞれ生成した (Fig. 6f)。

D. 考察

In vitro 代謝実験により、3-PPF および BZF の半減期をそれぞれ算出した。3-PPF の hLM 中の半減期は 10 分未満と極めて短く、体内でも速やかに代謝されると考えられた。一方で BZF の半減期は約 85 分と長く、生体試料から親化合物が検出できる可能性が示唆された。このことから、3-PPF の親化合物の検出は、摂取証明には適しておらず、代謝物による摂取証明が必要である可能性が示唆された。対して、BZF の親化合物は摂取証明に利用可能であることが考えられた。

LC-MS/MS 分析の結果、3-PPF では *N*-脱アルキル化および水酸化が、BZF では *N*-脱アルキル化、アミド加水分解および水酸化による代謝物がそれぞれ検出され、これらが各 FAs の主要な代謝経路であると推定された。FAs に関する先

行研究において、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体といった第 II 相代謝物が尿中から検出されることが報告されているが¹³⁻¹⁵、両化合物ともに LCMS-IT-TOF において第 II 相代謝物は検出されなかった。hLMs や hHEP を用いた *in vitro* 実験系における第 II 相代謝物の検出は微量であるか、もしくは検出されないとの報告もある¹⁶⁻¹⁸。以上のことから hLMs を用いた本研究においても、第 II 相代謝物は生成されなかったか、生成されたものの検出限界を下回っていたと考えられる。

LCMS-IT-TOF 分析により、P1、P3 および B3 の水酸基の位置を決定した。P1 は MS² スペクトル解析において *m/z* 203 のプロダクトイオンを生成したことから、*N*-アシル基で水酸化を受けたことが確認された。P3 の *m/z* を指定した EIC スペクトルにおいて 4 つのピークが検出され、MS² スペクトル解析により 4 つの一水酸化体における水酸基の結合部位を完全ではないが特定した。Rautio ら⁹は 3-PPF の代謝物として考えられる化合物を個別に合成して標準物質とし、hHEP サンプル中の代謝物由来のピークとその RT を比較することで、それぞれの一水酸化体の水酸基の位置の特定に成功しており、LC-QTOF での測定により 3-PPF の一水酸化体が 5 つ検出されたと報告している。それらの溶出順を本研究の結果と比較することで P3a-c の水酸基の位置を特定し、3-PPF のより詳細な代謝経路が明らかになった (Fig. 7)。P3d は LCMS-IT-TOF 測定により phenethylpiperidine 部分で水酸化を受けていると我々は推測しているが、先行研究における溶出の遅い 2 つの一水酸化体はいずれも *N*-アルキル鎖で水酸化を受けており、溶出順の比較を行っても完全な特定には至らなかった。

両 FAs の一水酸化体について水酸基の位置を明らかにしたことで、本研究で扱った 2 つの FAs においても、金森ら⁹が報告しているようにアミド側鎖の伸長により水酸化反応の反応部位が変化し、より *N*-アシル基で水酸化を受けやすくなることが確かめられた。加えて、詳細な代謝挙動の解明により、3-PPF は hLMs 中に

において、親化合物が反応開始初期から水酸化を受けたのちにさらに *N*-脱アルキル化を受けて P1 となる反応が最も主要な代謝経路であることが示された。

3-PPF の摂取証明のためのバイオマーカーとして、*in vitro* 試験終了時の検出強度から、酸化的 *N*-脱アルキル化体である P2 が利用可能であると考えられた。BZF の代謝物はいずれも反応開始後緩徐に生成されており、3-PPF と同様に B1 がバイオマーカーの候補と考えられた。FAs に関するいくつかの研究^{19,20)}において、未変化体の一部の構造である *N*-脱アルキル化体やアミド加水分解体は複数の類似体で検出されることが指摘されている。また *furanylfentanyl* や *butyrylfentanyl* に関する先行研究^{21,22)}において、*in vitro* 代謝物として最も多く検出されたのが nor 代謝物だったにもかかわらず、*in vivo* において微量しか検出されなかったことが報告されており、nor 代謝物は単体では適切なマーカーとならない可能性が示唆された。以上のことから、本研究において検出強度が最も高かった P2、B1 は *in vitro* 代謝から考えられるバイオマーカーの候補であるが、ヒトの尿サンプル等を用いた摂取証明の際には P3、B3 をはじめとした水酸化代謝物の検出についても考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

本研究では、FAs の一種である 3-PPF および BZF の代謝挙動の解明と、その摂取を証明しようとするバイオマーカーの特定を目的として hLMs を用いた *in vitro* 代謝実験を行い、LC-MS/MS および LCMS-IT-TOF を用いた分析を組み合わせ、両 FAs の詳細な代謝経路を推定した。

In vitro 代謝実験の結果、3-PPF の半減期は極めて短く、親化合物の検出は摂取証明には適さないことが示唆された。対して BZF は半減期が長く、親化合物が摂取証明に利用可能であることが示された。両 FAs はともに hLMs 中で水酸化を受けるが、よりアミド側鎖の長い 3-PPF は *N*-アシル基で水酸化を受けやすく、また水酸化

反応によって速やかに消失することが明らかになった。この構造と水酸化反応の関係は他の FAs でも報告されており、今後より多くの FAs の代謝プロファイルを明らかにすることで FAs の構造代謝相関の理解に貢献できると考えられた。両 FAs の摂取を証明するバイオマーカーとして、3-PPF では nor 代謝物が、BZF では親化合物と nor 代謝物が利用可能であるが、水酸化代謝物の検出も考慮することでより正確に摂取証明を行えることが示唆された。

F. 参考文献

- 1) United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Early warning advisory on new psychoactive substances. 2019. <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (accessed Sep 12, 2023).
- 2) United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Global Overview of Drug Demand and Supply. World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8). 2019: 1–77.
- 3) Vicknasingam B, Narayanan S, Singh D, et al. Global strategy for New Psychoactive Substances: an update. *Curr Opin Psychiatry*. 2020; **33**: 295–300.
- 4) O'Donnell J, Tanz LJ, Gladden RM, et al. Trends in and characteristics of drug overdose deaths involving illicitly manufactured fentanyl - United States, 2019–2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021; **70**: 1740–1746.
- 5) Kanamori T, Togawa IY, Segawa H, et al. Metabolism of fentanyl and acetylfentanyl in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-derived hepatocytes. *Biol Pharm Bull*. 2018; **41**:

- 106–114.
- 6) Kanamori T, Iwata YT, Segawa H, et al. Metabolism of butyrylfentanyl in fresh human hepatocytes: Chemical synthesis of authentic metabolite standards for definitive identification. *Biol. Pharm. Bull.* 2019; **42**: 623–30.
 - 7) Wallgen J, Vikingsson S, Rautio T, et al. Structure elucidation of urinary metabolites of fentanyl and five fentanyl analogs using LC-QTOF-MS, hepatocyte incubations and synthesized reference standards. *J Anal Toxicol.* 2020; **44**: 993–1003.
 - 8) Kanamori T. Study of the metabolism of new drugs of abuse. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2019; **139**: 699–704.
 - 9) Rautio T, Vangerven D, Dahlén J, et al. In vitro metabolite identification of acetylbenzylfentanyl, benzoylbzylfentanyl, 3-fluoro-methoxyacetyl fentanyl, and 3-phenylpropanoylfentanyl using LC-QTOF-HRMS. *Drug Test Anal.* 2023; **15**: 711–729.
 - 10) Trana AD, Brunetti P, Giorgetti R, et al. In silico prediction, LC-HRMS/MS analysis, and targeted/untargeted data-mining workflow for the profiling of phenylfentanyl in vitro metabolites. *Talanta.* 2021; **235**: 122740.
 - 11) Erratico C, Negreira N, Norouzizadeh H, et al. In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Drug Test Anal.* 2015; **7**: 866–876.
 - 12) Kadomura N, Ito T, Kawashima H, et al. In vitro metabolic profiles of adamantyl positional isomers of synthetic cannabinoids. *Forensic Toxicol.* 2021; **39**: 26–44.
 - 13) Wilde M, Pichini S, Pacifici R, et al. Metabolic pathways and potencies of new fentanyl analogs. *Front Pharmacol.* 2019; **10**: 238.
 - 14) Melent'ev AB, Kataev SS, Dvorskaya ON. Identification and analytical properties of acetyl fentanyl metabolites. *J Anal Chem.* 2015; **70**: 240–248.
 - 15) Meyer MR, Dinger J, Schwaninger AE, et al. Qualitative studies on the metabolism and the toxicological detection of the fentanyl-derived designer drugs 3-methylfentanyl and isofentanyl in rats using liquid chromatography-linear ion trap-mass spectrometry (LC-MS(n)). *Anal Bioanal Chem.* 2012; **402**: 1249–1255.
 - 16) Feasel MG, Wohlfarth A, Nilles JM, et al. Metabolism of carfentanil, an ultra-potent opioid, in human liver microsomes and human hepatocytes by High-Resolution Mass Spectrometry. *AAPS J.* 2016; **18**: 1489–1499.
 - 17) Kanamori T, Iwata TY, Segawa H, et al. Metabolism of fentanyl and acetylfentanyl in human-induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Biol Pharm Bull.* 2018; **41**: 106–114.
 - 18) Gundersen POM, Åstrand A, Gréen H, et al. Metabolite profiling of ortho-, meta- and para-fluorofentanyl by hepatocytes and high-resolution mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2020; **44**: 140–148.
 - 19) Vikingsson S, Rautio T, Wallgren J, et al. LC-QTOF-MS identification of major urinary cyclopropylfentanyl metabolites using synthesized standards. *J Anal Toxicol.* 2019; **43**: 607–614.
 - 20) Salomone A, Palamar JJ, Bigiarini R, et al. Detection of fentanyl analogs and synthetic opioids in real hair samples. *J Anal Toxicol.* 2019; **43**: 259–265.
 - 21) Watanabe S, Vikingsson S, Roman M, et al. In vitro and in vivo metabolite identification studies for the new synthetic opioids acetylfentanyl, acrylfentanyl, furanylfentanyl, and 4-fluoro-isobutyrylfentanyl. *AAPS J.* 2017; **19**: 1102–1122.
 - 22) Steuer AE, Williner E, Stacheli SN, et al.

Studies on the metabolism of the fentanyl-derived designer drug butyrfentanyl in human in vitro liver preparations and authentic human samples using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). *Drug Test Anal.* 2017; **9**: 1085–1092.

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特記事項なし

2. 学会発表

岩井康晴, 伊藤宏輔, 森川美空, 木下智絵, 曾田翠, 種田靖久, 北市清幸: フェンタニル類似体 benzoylfentanyl および 3-phenylpropanoylfentanyl の摂取証明に向けた代謝研究. 第53回日本神経精神薬理学会年会. 東京, 2023年9月7-9日

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

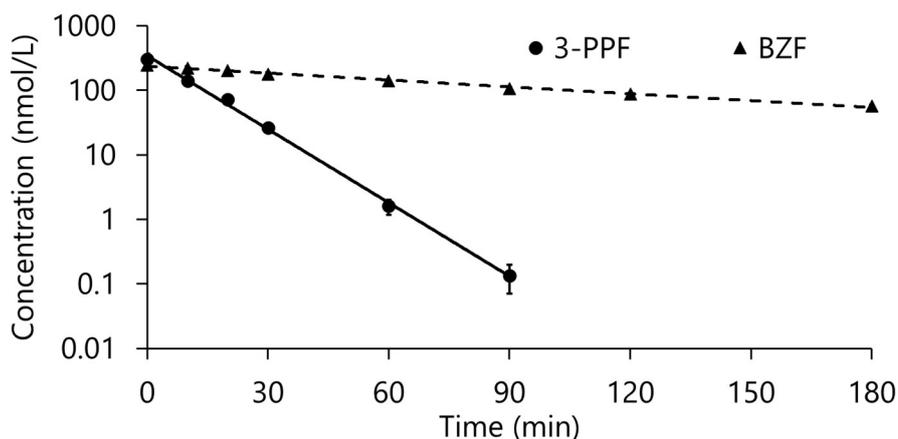


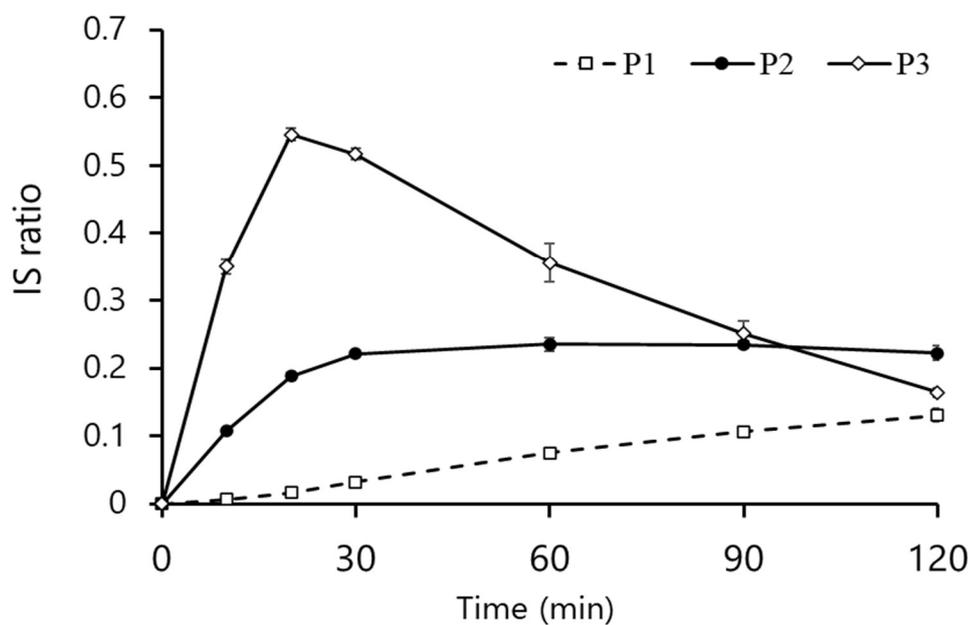
Fig. 1 Time-dependent decrement of 3-PPF and BZF in hLMs

Each data represents mean \pm SD (n = 3).

Table 1 Detected parent compounds and metabolites of 3-PPF and BZF using LC-MS/MS

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Formula	RT(min)	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)	CE (V)
P1	Oxidative N-dealkylation + hydroxylation	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	1.92	325.19	84.08	24
P2	Oxidative N-dealkylation	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O	3.86	309.2	84.08	19
P3	Hydroxylation	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O ₂	5.45	429.25	188.2	24
3-PPF	–	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O	8.63	413.26	188.2	27
B1	Oxidative N-dealkylation	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O	10.81	281.16	84.15	16
B2	Amide hydrolysis	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	13.21	281.2	188.2	15
B3	Hydroxylation	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₂	14.7	401.22	204.15	22
BZF	–	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O	16.09	385.15	188.2	24

a) 3-PPF



b) BZF

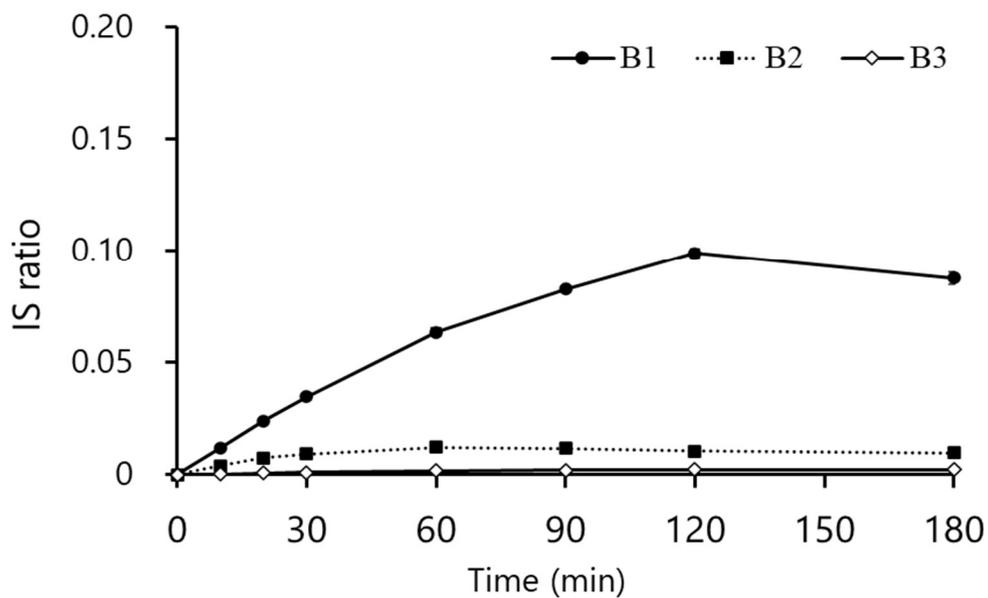


Fig. 2 Temporal alteration of the metabolites of (a) 3-PPF and (b) BZF in hLMs
Each data represents mean \pm SD ($n = 3$). The same metabolic reactions are shown with the same marker.

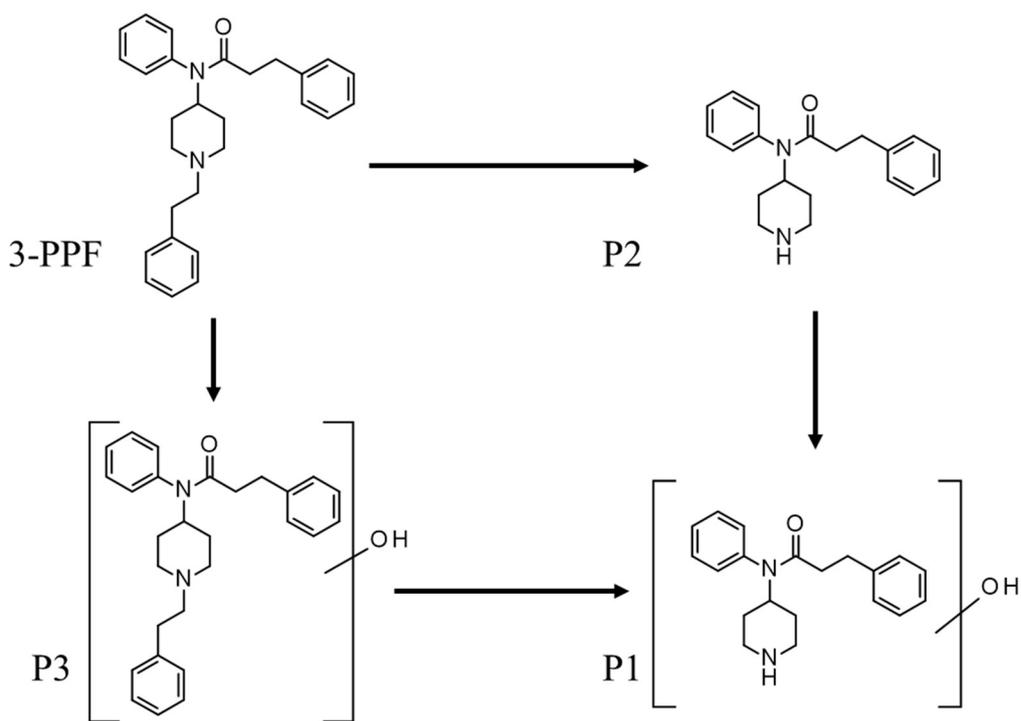


Fig. 3 Proposed metabolic pathways of 3-PPF using LC-MS/MS

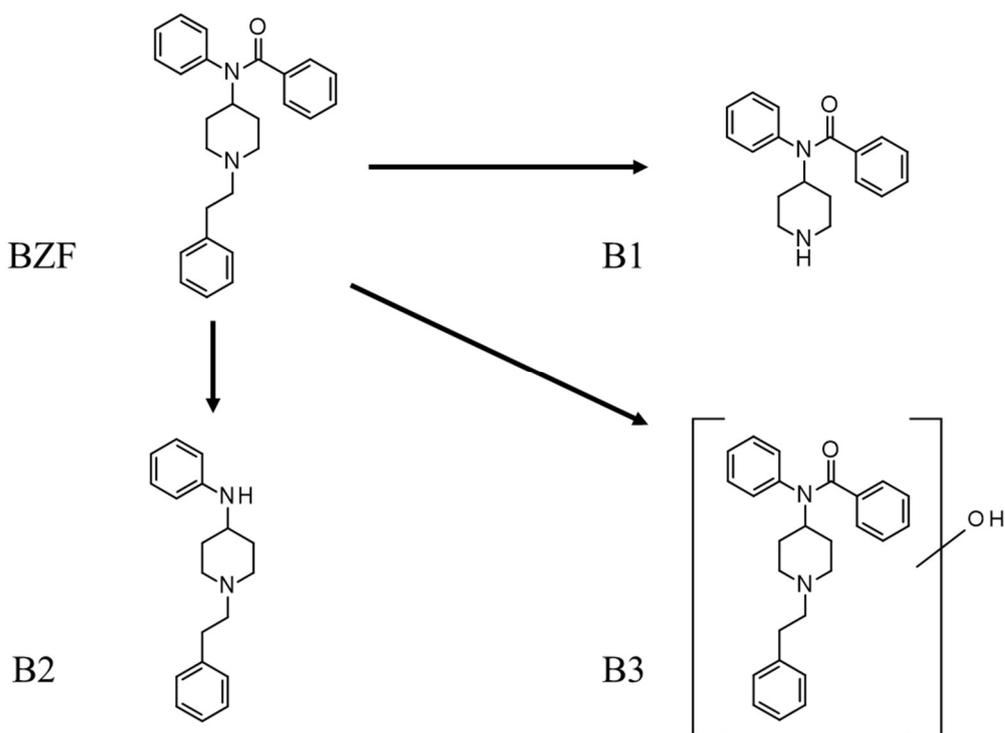
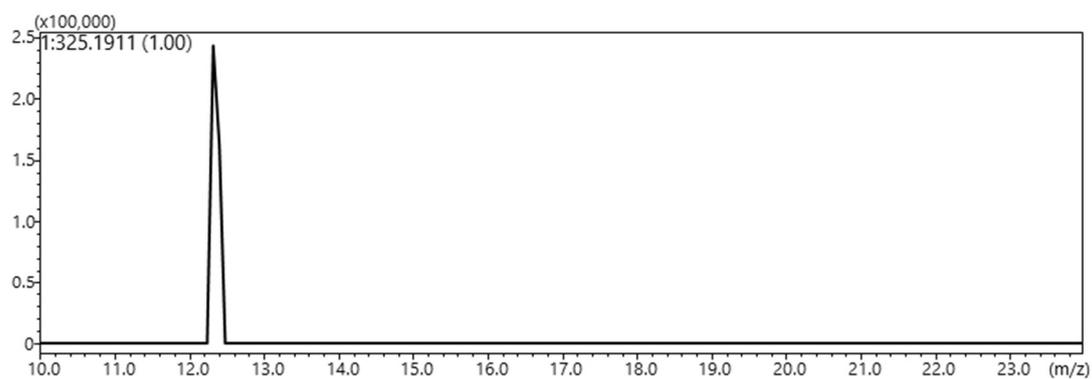


Fig. 4 Proposed metabolic pathways of BZF using LC-MS/MS

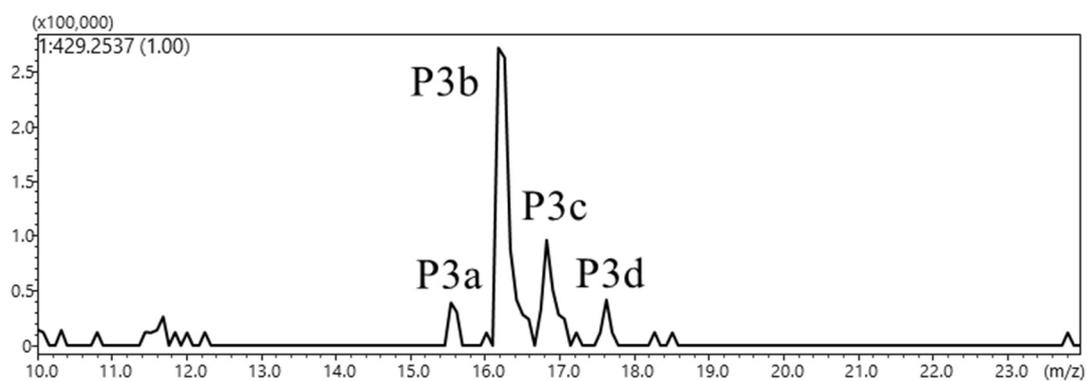
Table 2 Detected metabolites of 3-PPF and BZF using LCMS-IT-TOF

Parent compound and Metabolites	Proposed metabolic pathway	Formula	Measured [M+H] ⁺ (m/z)	Theoretical [M+H] ⁺ (m/z)	Mass error (ppm)	RT(min)	Measured fragments (m/z)
P1	Oxidative <i>N</i> -dealkylation + hydroxylation	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	325.1913	325.1911	0.6	12.409	203
P3a	Hydroxylation	C ₂₈ H ₃₂ N ₂ O ₂	429.2534	429.2537	0.7	15.620	188 281
P3b			429.2544	429.2537	1.6	16.262	188 281 307 323 411
P3c			429.2527	429.2537	2.3	16.824	188 281
P3d			429.2533	429.2537	0.9	17.627	186 204 279 411
B3	Hydroxylation	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₂	401.2210	401.2224	3.5	18.911	186 204 383

a) P1



b) P3



c) B3

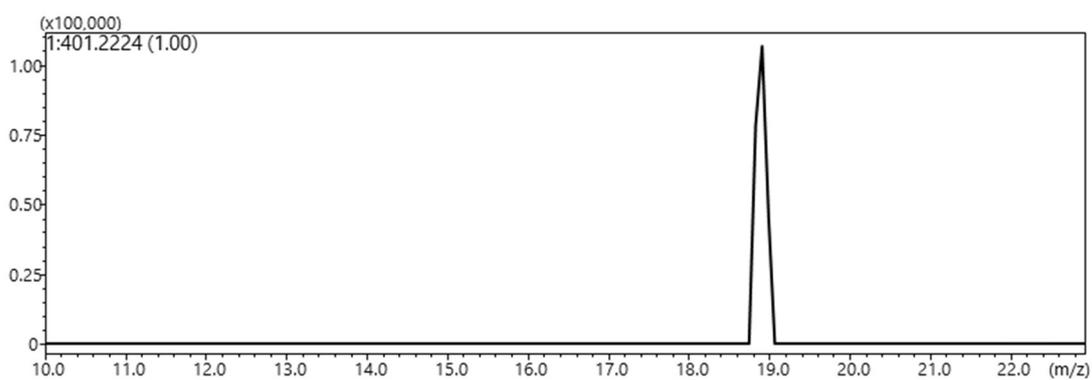


Fig. 5 EIC spectra of (a) P1, (b) P3, and (c) B3 by using LCMS-IT-TOF

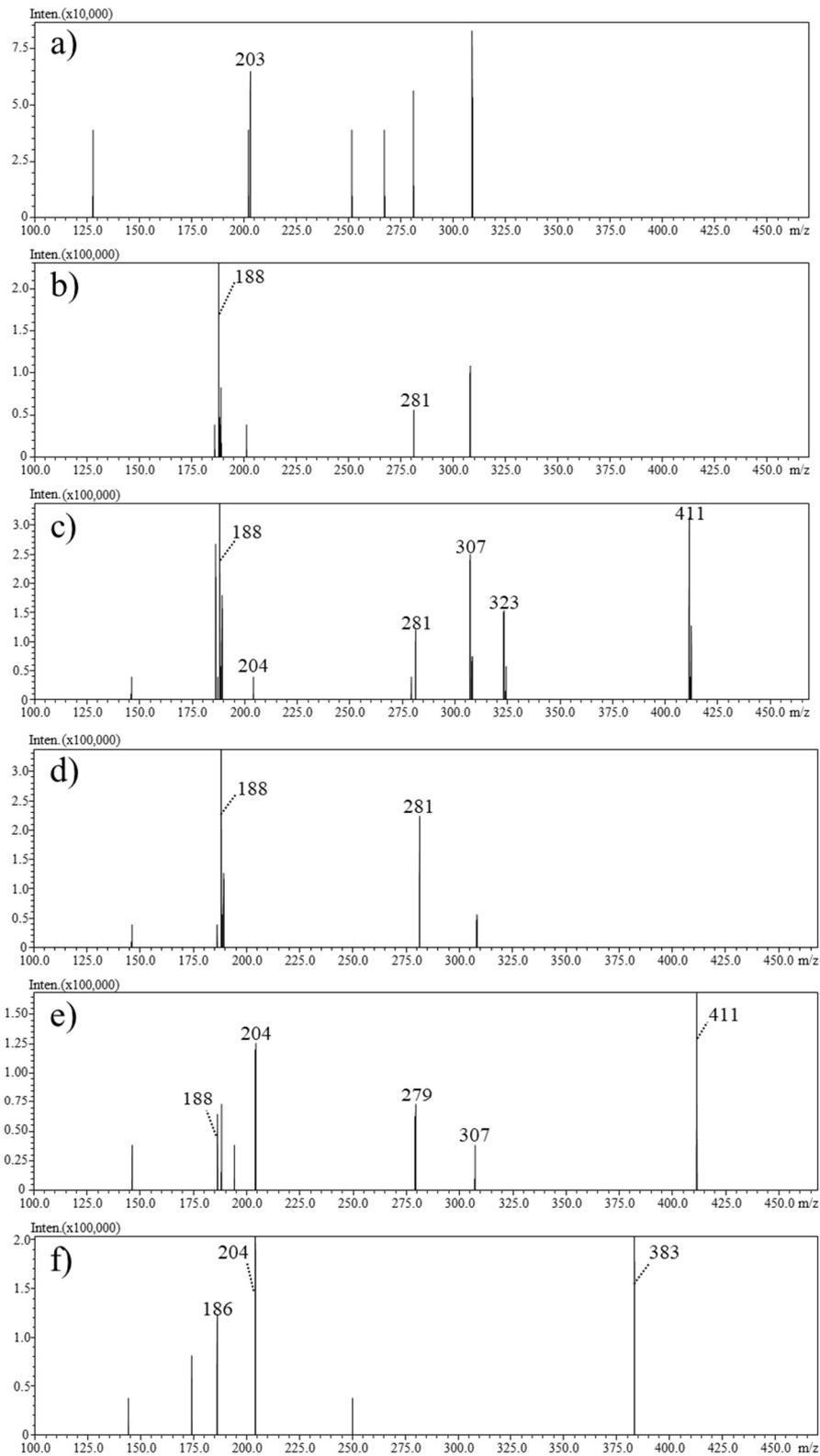


Fig. 6 MS² spectra of (a) P1, (b–e) P3a–d, and (f) B3 using LCMS-IT-TOF

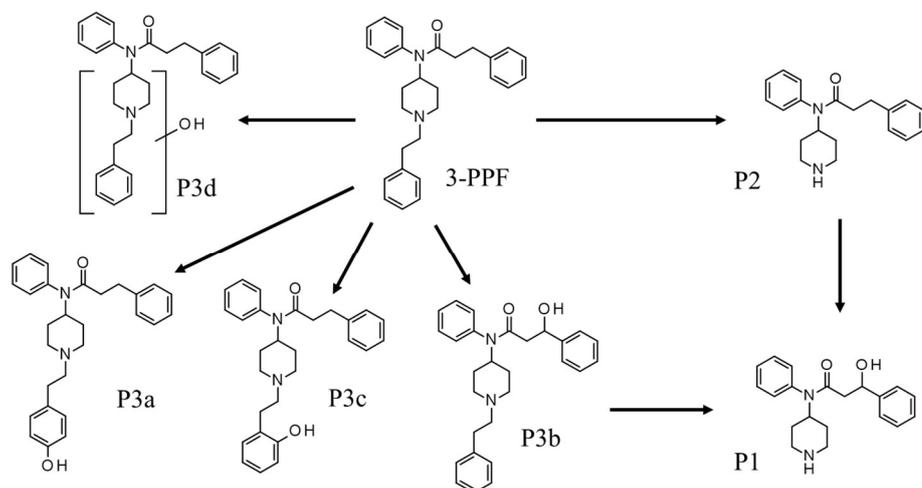


Fig. 7 Proposed detailed metabolic pathways of 3-PPF using LC-MS/MS and LCMS-IT-TOF

令和5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)
危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究(21KC1003)

分担研究報告書

大麻を乱用する少年における新たな大麻関連製品、
危険ドラッグの乱用実態に関する研究

研究分担者 嶋根卓也（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 中島美鈴（肥前精神医療センター）
牧草由紀夫（福岡県保健医療介護部薬務課）
山口由美子（福岡県保健医療介護部薬務課）
平井祥一（福岡県保健医療介護部薬務課）
山崎裕宣（福岡県警察本部生活安全部少年課）
森 治美（福岡県警察本部生活安全部少年課）

【研究要旨】

[緒言] 近年、電子タバコ（ベイパー）で使用するワックスやリキッドタイプの大麻製品（Vaping Marijuana:以下、大麻パイプと表記）が押収される事件が増加している背景を受け、本研究では10代の大麻使用少年における大麻パイプを含む大麻の使用実態および大麻パイプ使用者の心理社会的な特徴を明らかにすることを目的とした。

[方法] 福岡県保健医療介護部が実施する大麻支援プログラム（F-CAN）に参加した大麻使用少年のうち、研究参加の同意が得られた20名を研究対象とした。プログラム実施協力機関の担当者による面接および少年による自記式調査により、必要な情報を収集した。

[結果]対象者の85%に過去1年以内の大麻パイプ使用が認められた。大麻パイプ使用者は全員が乾燥大麻も併用していた。一方、危険ドラッグを併用していたのは11.8%にとどまった。大麻パイプを使用する少年は、使用しない少年に比べて、薬物関連問題の重症度（DAST-20スコア）が高く（パイプ群8.9点、対照群4.3点）、大麻使用日数が多く（パイプ群5.0日、対照群0.3日）、過去1年以内にビンジ飲酒を経験している割合が高い傾向がみられたが（パイプ群82.4%、対照群33.3%）、いずれも有意差は検出されなかった。大麻パイプのメリット・デメリットとしては、「乾燥大麻の喫煙に比べて、少ない手順・準備で使うことができ便利である」というメリットや、「乾燥大麻の喫煙に比べて、値段が高い（単価が高い、電子タバコの器具が高い）」というデメリットを選択する回答が多かった。

[考察] 対象者の85%に大麻パイプの使用が認められた。この結果は、少年たちの中で、従来の乾燥大麻だけではなく、電子タバコ型の大麻パイプが広く浸透していることを示唆している。また、少年たちは、大麻パイプにはメリット・デメリットの両面があることを認識していた。大麻パイプを使用する少年の心理社会的な特徴として、大麻の使用頻度が高い、薬物関連問題の重症度が高い、ビンジ飲酒経験があるといった傾向が確認されたが、有意差を検出することができなかった。これは恐らく、対照群（大麻パイプを使っていない少年）が少ないことによる検出力の

問題と考えられる。十分な対象者が確保できなかった背景には、大麻を使用する少年たちの治療動機は決して高くはなく、プログラムにつながりにくい結果となったことが考えられる。

[結論]大麻パイプは、10代の大麻使用少年たちの間で広く浸透していた。高濃度のTHCを含有する大麻パイプ使用者は、非使用者よりも薬物関連問題が高く、大麻の使用頻度が高いなどの傾向がみられるものの、サンプルサイズの影響により有意差は検出できなかった。大麻パイプ使用者の心理社会的な特徴を見出すためには、今後、対象者のさらなるリクルートが必要である。

A. 研究目的

近年、電子タバコ（ベイパー）で使用するワックスやリキッドタイプの大麻製品（Vaping Marijuana:以下、大麻パイプと表記）が押収される事件が増加している。全米の青少年を対象とする薬物調査として知られる Monitoring the Future では、2017年より大麻パイプの使用状況についての調査が始まり、従来の乾燥大麻の使用率を大麻パイプの使用率が上回ったという報告もある¹。また、大麻パイプ（および電子タバコ）の使用に伴う二次的な急性肺障害の発生が指摘されており、電子タバコまたはパイプ製品関連肺障害（E-cigarette- or vaping product-associated lung injury）という言葉も使われるようになった²。

大麻パイプに関する先行研究としては、前述したモニタリング調査の他、タバコ製品との併用に関する研究^{3,4}や、使用動機に関する質的研究⁵などが報告されているものの、大麻パイプ使用者の薬物依存の重症度、大麻パイプを選択するメリット、大麻に対する考え・感情・信念といった心理社会的な側面を量的に調べた研究は未だにない。そこで、本研究では10代の大麻使用少年における大麻パイプを含むの大麻の使用実態および大麻パイプ使用者の心理社会的な特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 研究対象者

研究対象となるのは、福岡県保健医療介護部薬務課（以下、福岡県薬務課と表記）の事業であり、福岡県警少年サポートセンターが実施協

力している少年用大麻再乱用防止プログラム（以下、F-CANと表記）に参加する大麻使用少年である。2021年9月から2024年1月までの間に、計25名の大麻使用少年がF-CANへの参加申込みを行った。このうち、選択基準を満たす20名より研究参加の同意を得た（同意取得率80%）。本研究ではこの20名を分析対象者とした。

2. インフォームドコンセント

本研究の実施にあたっては、説明文書を用いて研究対象者に通知し、研究対象者が研究対象になることを拒否できる機会を保障するために、アンケート用紙の冒頭で、研究参加への同意の有無をチェックボックスにて確認した。なお、未成年者に該当する場合、本人および保護者の双方から同意を得た。また、研究開始後に、同意を撤回する場合は、F-CAM担当者を窓口とし、福岡県薬務課を介して、研究責任者に報告する流れとした。本研究の研究計画書は、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A2021-124）。

3. 調査項目

大麻使用に関連する項目：初回使用年齢、大麻の初回使用年齢、過去1年以内の大麻の使用頻度（乾燥大麻、大麻パイプ、大麻成分を含んだ食品）、大麻と飲酒の併用頻度、大麻に対する考え・感情・信念（Marijuana Effect Expectancy Questionnaire、6項目）⁶、大麻パイプを選択するメリット・デメリット（7項目）

大麻以外の薬物使用：過去1年以内の危険ドラッグ、覚醒剤、有機溶剤、MDMA、コカイン、ヘロイン、LSD、処方薬乱用、市販薬乱用
薬物依存に関連する項目：薬物関連問題の重症

度 (DAST-20 日本語版)^{7,8}、物質使用障害 M.I.N.I (精神疾患簡易構造化面接法)

その他の調査項目：過去1年以内のタバコの使用状況 (紙巻きタバコ、加熱式タバコ、電子タバコ)、過去1年以内の飲酒頻度、ビンジ飲酒頻度、基本属性 (性別、年齢、学歴、職歴など)

4. 統計解析

過去1年以内の大麻パイプの使用歴に基づき、対象者をパイプ群と対照群に分類した。基本属性、大麻使用に関連する項目、大麻以外の薬物使用、薬物依存に関連する項目について群間比較を行った。カテゴリカル変数についてはフィッシャーの正確確率法で、連続変数についてはt検定にて有意差を検定した。

C. 研究結果

1. 基本属性および喫煙・飲酒の状況

表1に対象者の基本属性および喫煙・飲酒に関する結果を示した。対象者の平均年齢は16.9歳、性別は男性50%、女性45%、その他5%であった。事前アンケート実施時に学校に在籍していたのは全体35%であり、65%は学校に在籍していなかった。一方、対象者の55%は何らかの仕事に従事していた。対象者全体が過去1年以内に紙巻きタバコによる喫煙を経験しており、加熱式タバコも85%が経験していた。対象者の95%は過去1年以内に飲酒経験があり、75%はビンジ飲酒の経験もみられた。

2. 大麻使用に関する結果

表2に大麻使用に関連する結果を示した。大麻の初回使用年齢は14.6歳であり、過去1ヶ月以内の使用日数は平均4.0日間であった。対象者全員が過去1年以内に乾燥大麻 (ハッパ、ジョイント) を使用しており、大麻パイプは85%、大麻食品は20%、大麻樹脂は15%が経験していた。大麻使用時の飲酒併用 (過去1年以内) は、対象者全体の55%が経験していた。

3. 大麻以外の併用薬物および依存症関連項目

表3に大麻以外の併用薬物の使用経験および依存症関連項目の結果を示した。併用薬物としては、処方薬乱用が最も多く (50.0%)、市販薬乱用 (45.0%)、MDMA (45.0%)、LSD (45.0%)、有機溶剤 (35.0%) と続いた。薬物関連問題の重症度を示す DAST-20 スコアは平均 8.2 点であり、全体の 80.0% がカットオフ値を上回る DAST 陽性であった。MINI による評価結果は、対象者の 90% が薬物乱用に該当し、55% が薬物依存の診断に該当した。

4. 大麻に対する考え・感情・信念 (MEEQ-B)

表4に大麻に対する考え・感情・信念を測定する MEEQ-B の結果を示した。「大麻は、人により創造的に感じさせ、物事をいつもと異なった形で認識させる (音楽の聞こえ方が違う、物事がより面白く見える)」という項目に対して全体の 85% の対象者が「とてもそう思う」と回答した。また、「大麻は、人の体に影響し、ある欲求 (空腹になる、口が乾く、笑いが止まらなくなる) を引き起こす。」という項目に対して全体の 75% の対象者が「とてもそう思う」と回答した。

5. 大麻パイプのメリット・デメリット

表5、図1に大麻パイプのメリット・デメリットに関する結果を示した。それぞれのメリット・デメリットに対して「そう思う」と回答したのは、「少ない手順・準備で使うことができ、便利である」87.5%、「値段が高い」75.0%、「効率性が高いというメリットがある」68.8%、「発生がする煙が少なく、匂いが少ないというメリットがある」62.5%、「煙を吸い込む伝統的な儀式がない」43.8%、「得られる作用が強い」37.5%、「健康的な使用方法である」12.5%、であった。

6. 大麻パイプ使用者の特徴

過去1年以内に大麻パイプの使用が認められた大麻パイプ使用者の心理社会的な特徴を明らかにするために、大麻パイプの経験がない対照群との比較結果を各表に示した (表1~3)。大

麻ベープ使用者は全員が乾燥大麻も併用していた。一方、危険ドラッグを併用していたのは11.8%にとどまった。大麻ベープを使用する少年は、使用しない少年に比べて、薬物関連問題の重症度（DAST-20スコア）が高く（ベープ群8.9点、対照群4.3点）、大麻使用日数が多く（ベープ群5.0日、対照群0.3日）、過去1年以内にビンジ飲酒を経験している割合が高い傾向がみられたが（ベープ群82.4%、対照群33.3%）、いずれも有意差は検出されなかった。

D. 考察

対象者の85%に大麻ベープの使用が認められた。この結果は、少年たちの間で、従来の乾燥大麻だけではなく、電子タバコ型の大麻ベープが広く浸透していることを示唆している。また、大麻使用少年たちは、大麻ベープに対して「少ない手順・準備で使うことができ、便利である」や「効率性が高いというメリットがある」というメリットを感じつつも、「値段が高い」というデメリットを感じている回答も多く、10代の若者にとっては高価な代物になっている様子が見られた。

大麻ベープを使用する少年の心理社会的な特徴として、大麻の使用頻度が高い、薬物関連問題の重症度が高い、ビンジ飲酒経験があるといった傾向が確認されたが、有意差を検出することができなかった。これは恐らく、対照群（大麻ベープを使っていない少年）が少ないことによる検出力の問題と考えられる。研究計画時には、年間30名程度の大麻使用少年をリクルートできると見込んでいたものの、実際には計20名のリクルートにとどまっている。十分な対象者が確保できなかった背景には、大麻を使用する少年たちの治療動機は決して高くはなく、プログラムにつながりにくい結果となったことが考えられる。

E. 結論

大麻ベープは、10代の大麻使用少年たちの間

で広く浸透していることが明らかとなった。高濃度のTHCを含有する大麻ベープ使用者は、非使用者よりも薬物関連問題が高く、大麻の使用頻度が高いなどの傾向がみられるものの、サンプルサイズの影響により有意差は検出できなかった。大麻ベープ使用者の心理社会的な特徴を見出すためには、今後、対象者のさらなるリクルートが必要である。

F. 参考文献

1. Monitoring the Future national survey results on drug use, 1975-2021 Data for In-School Surveys of 8th, 10th, and 12th Grade Students, Institute for Social Research, The University of Michigan. <http://monitoringthefuture.org/data/21data.htm>
2. Cherian SV, et al. E-Cigarette or Vaping Product-Associated Lung Injury: A Review. *Am J Med.* 2020 Jun;133(6):657-663. doi: 10.1016/j.amjmed.2020.02.004. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32179055.
3. Trivers KF, et al. Prevalence of Cannabis Use in Electronic Cigarettes Among US Youth. *JAMA Pediatr.* 2018 Nov 1;172(11):1097-1099.
4. Kowitt SD, et al. Vaping cannabis among adolescents: prevalence and associations with tobacco use from a cross-sectional study in the USA. *BMJ Open.* 2019.
5. Aston ER, et al. Vaporization of Marijuana Among Recreational Users: A Qualitative Study. *J Stud Alcohol Drugs.* 2019.
6. Torrealday O, et al. Validation of the Marijuana Effect Expectancy Questionnaire-Brief. *J Child Adolesc Subst Abuse.* 2008;17(4):1-17.
7. Shimane T, et al. [Reliability and validity of the Japanese version of the DAST-20]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* 2015 Dec;50(6):310-24. Japanese. PMID: 26964292.
8. Skinner, H.: The Drug Abuse Screening Test. *Addictive Behaviors,* 7: 363–371, 1982

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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 嶋根卓也 : 大麻を使う若者たちとのコミュニケーションー有効な、有効ではない予防教育ー. 刑政 134(7) : 38-49, 2023.
- 2) 嶋根卓也 : 薬物問題の現状と課題ー疫学と国の対策ー. IIアディクション各論ー1.物質使用症, 精神科治療学第 38 巻増刊号 : 78-83, 2023.
- 3) 嶋根卓也 : 1 章 物質使用症群 物質使用症の疫学 薬物使用. 物質使用症又は嗜癖行動症群 性別不合 (講座 精神疾患の臨床) (樋口進 編), 中山書店, 東京, pp24-40, 2023.
- 4) 嶋根卓也 : Topics 大麻合法化とその影響. 物質使用症又は嗜癖行動症群 性別不合 (講座 精神疾患の臨床) (樋口進 編), 中山書店, 東京, pp161-169,2023.
- 5) 嶋根卓也 : 日本における薬物依存の現状. 第 10 章 10.1 薬物依存, アルコール・薬物・ギャンブル・ゲームの依存ケアサポート (樋口進 監修), 講談社, 東京, pp122-135, 2023.

2. 学会発表

- 10) Nakashima M, Kodama N, Mori H, Shimane T: Development of juvenile cannabis relapse prevention program (F-CAN) focusing on communication skills with familiar people. 10th World Congress of Cognitive and Behavior Therapies. Soul, 2023.6.1.

表1. 基本属性および喫煙・飲酒の状況

	全体 (n=20)		大麻パイプ 対照群(n=3)		パイプ群(n=17)		p-value
	n	%	n	%	n	%	
調査時年齢							
平均 (SD)	16.9	(2.0)	16.3	(0.6)	16.9	(2.2)	0.641
性別							0.645
男性	10	50.0%	1	33.3%	9	52.9%	
女性	9	45.0%	2	66.7%	7	41.2%	
その他	1	5.0%	0	0.0%	1	5.9%	
学校への在籍 (調査時)							0.282
はい	7	35.0%	0	0.0%	7	41.2%	
いいえ	13	65.0%	3	100.0%	10	58.8%	
仕事をしている (調査時)							0.218
はい	11	55.0%	3	100.0%	8	47.1%	
いいえ	9	45.0%	0	0.0%	9	52.9%	
タバコ使用あり (過去1年以内)							
紙巻きタバコ	20	100.0%	3	100.0%	17	100.0%	
加熱式タバコ	17	85.0%	3	100.0%	14	82.4%	1.000
電子タバコ (ニコチンあり)	3	15.0%	1	33.3%	2	11.8%	0.404
電子タバコ (ニコチンなし)	5	25.0%	0	0.0%	5	29.4%	0.539
飲酒あり (過去1年以内)	19	95.0%	3	100.0%	16	94.1%	1.000
ビンジ飲酒あり	15	75.0%	1	33.3%	14	82.4%	0.140

表2. 大麻使用状況に関する結果

	全体 (n=20)		大麻パイプ				p-value
	n	%	対照群(n=3)		パイプ群(n=17)		
	n	%	n	%	n	%	
初回大麻使用年齢							0.464
平均年齢	14.6	(1.8)	15.3	(0.6)	14.5	(1.9)	
過去1ヶ月間での大麻使用日数							0.420
平均日数	4.0	(8.2)	0.3	(0.6)	5.0	(8.7)	
大麻使用に対する渴望							1.000
使いたい	7	35.0%	1	33.3%	6	35.3%	
使いたくない	13	65.0%	2	66.7%	11	64.7%	
大麻の形状							
乾燥大麻 (ハッパ、ジョイント)	20	100.0%	3	100.0%	17	100.0%	-
大麻パイプ	17	85.0%	0	0.0%	17	100.0%	-
大麻樹脂 (チョコ)	3	15.0%	0	0.0%	3	17.6%	1.000
大麻食品	4	20.0%	0	0.0%	4	23.5%	1.000
大麻使用時の飲酒併用							0.566
あり	11	55.0%	1	33.3%	10	58.8%	
なし	9	45.0%	2	66.7%	7	41.2%	

表3. 大麻以外の併用薬物および依存症関連項目

	全体 (n=20)		大麻パイプ				p-value
	n	%	対照群(n=3)		パイプ群(n=17)		
	n	%	n	%	n	%	
過去1年以内の薬物使用 (大麻以外)							
有機溶剤	7	35.0%	1	33.3%	6	35.3%	1.000
覚醒剤	2	10.0%	1	33.3%	1	5.9%	0.284
危険ドラッグ	2	10.0%	0	0.0%	2	11.8%	1.000
MDMA	9	45.0%	1	33.3%	8	47.1%	1.000
コカイン	4	20.0%	0	0.0%	4	23.5%	1.000
ヘロイン	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	-
LSD	9	45.0%	1	33.3%	8	47.1%	1.000
処方薬乱用	10	50.0%	2	66.7%	8	47.1%	1.000
市販薬乱用	9	45.0%	0	0.0%	9	52.9%	0.218
その他	4	20.0%	0	0.0%	4	23.5%	1.000
DAST-20							
スコア平均値	8.2	(4.5)	4.3	(3.8)	8.9	(4.3)	0.106
DAST陽性	16	80.0%	2	66.7%	14	82.4%	0.509
MINI							
薬物依存	11	55.0%	1	33.3%	10	58.8%	0.566
薬物乱用	18	90.0%	2	66.7%	16	94.1%	0.284

表4. 大麻に対する考え・感情・信念 (MEEQ-B) (n=20)

	まったくそう 思わない		どちらとも 言えなさそう		どちらとも 言えない		どちらか と言えなさそう		とても そう思う	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	Item1. 大麻は、考えることや何かを行うことを困難にさせる（集中力や理解力が低下する、動作がゆっくりとなる）	6	30.0%	1	5.0%	1	5.0%	6	30.0%	6
Item2. 大麻は、人をリラックスさせ、緊張を和らげる（心を落ち着かせ、くつろぎやすくなります）ことに役立つ。	3	15.0%	1	5.0%	0	0.0%	4	20.0%	12	60.0%
Item3. 大麻は、人と仲良くなることを助け、より性的に開放的な気分にする（より話すようになる、よりロマンチックな気分になる）	2	10.0%	3	15.0%	1	5.0%	7	35.0%	7	35.0%
Item4. 大麻は、人をより創造的に感じさせ、物事をいつもと異なった形で認識させる（音楽の聞こえ方が違う、物事がより面白く見える）	1	5.0%	1	5.0%	0	0.0%	1	5.0%	17	85.0%
Item5. 大麻は、一般的に人に悪い影響（怒りっぽくなったり、不注意になったり、気分が高まった後に落ち込んだりする）を与える	4	20.0%	6	30.0%	4	20.0%	2	10.0%	4	20.0%
Item6. 大麻は、人の体に影響し、ある欲求（空腹になる、口が乾く、笑いが止まらなくなる）を引き起こす。	1	5.0%	1	5.0%	0	0.0%	3	15.0%	15	75.0%

表5. 大麻パイプのメリット・デメリット (n=17)

	そう思わない		どちらとも言えない		そう思う	
	n	%	n	%	n	%
Item1. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、発生がする煙が少なく、匂いが少ないというメリットがある	4	25.0%	2	12.5%	10	62.5%
Item2. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、少ない手順・準備で使うことができ、便利である	2	12.5%	0	0.0%	14	87.5%
Item3. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、効率性が高い（コスパが高い）というメリットがある	4	25.0%	1	6.3%	11	68.8%
Item4. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、得られる作用が強い。	7	43.8%	3	18.8%	6	37.5%
Item5. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、健康的な使用方法である（肺への影響が少ないなど）	10	62.5%	4	25.0%	2	12.5%
Item6. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、値段が高い（単価が高い、電子タバコの器具が高い）	2	12.5%	2	12.5%	12	75.0%
Item7. 電子タバコによる大麻吸入は、乾燥大麻の喫煙に比べて、煙を吸い込む伝統的な儀式がない	4	25.0%	5	31.3%	7	43.8%

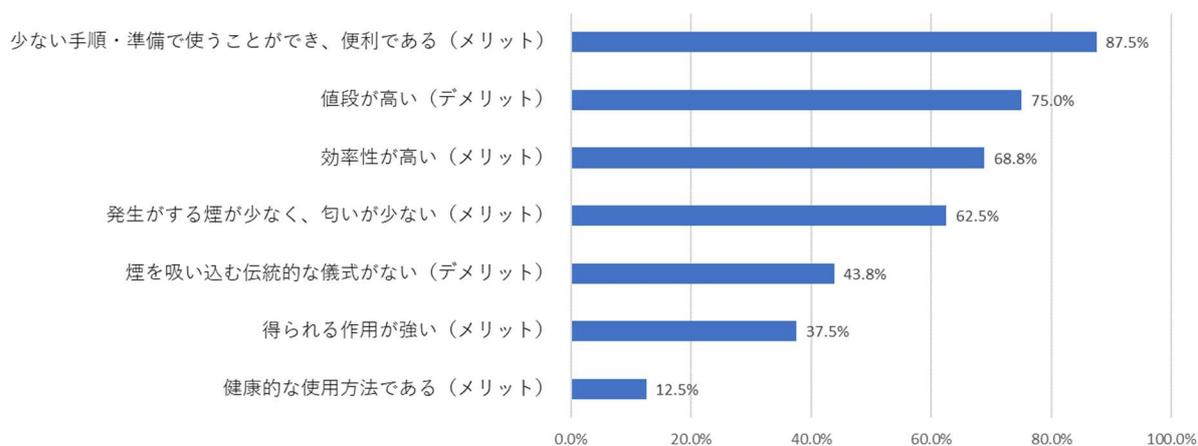


図1. 大麻パイプと乾燥大麻との比較 (大麻パイプのメリット・デメリット)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moriya S, Funaki K, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.	Synthesis and properties of PNA containing a dicationic nucleobase based on N4-benzoylated cytosine.	<i>Bioorg Med Chem Lett.</i>	2023	May 15;88:129 287.	2023
Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.	Bis(nitrato-κO)(1,4,8,11-tetra-aza-cyclo-tetra-decane-κ4 N)zinc(II) methanol monosolvate.	<i>IUCrdata</i>	2022	Aug 31;7(Pt 8):x22085 4.	2022
Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.	PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA.	<i>Peptide Science 2021</i>	2022	111-112	2022
Miyazaki, I. and <u>Asanuma, M.</u>	Multifunctional Metallothioneins as a Target for Neuroprotection in Parkinson's Disease.	Antioxidants	12 (4)	894	2023
Murata, H., Phoo, M.T.Z., Ochi, T., Tomonobu, N., Yamamoto, K., Kinoshita, R., Miyazaki, I., Nishibori, M., <u>Asanuma, M.</u> and Sakaguchi, M.	Phosphorylated SARM1 is involved in the pathological process of rotenone-induced neurodegeneration.	J. Biochem.	174 (6)	533-548	2023
Masai, K., Nakayama, Y., Shin, K., Sugahara, C., Miyazaki, I., Yasuhara, T., Date, I. and <u>Asanuma, M.</u>	Neurogenesis impairment with glial activation in the hippocampus-connected regions of intracerebroventricular streptozotocin-injected mice.	Neurosci. Lett.	820	137598	2024
Ito S, Mori M, Matsuo M, Yamasaki R, Oida Y, Soda M, Kitaichi K	Establishment to measure oxycodone in plasma with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.	Neuropsychopharmacol Rep	42	299-305	2022
<u>嶋根卓也</u>	大麻を使う若者たちとのコミュニケーションー有効な、有効ではない予防教育ー	刑政	134(7)	38-49	2023

<u>嶋根卓也</u>	薬物問題の現状と課題－疫学と国の対策－. II アディクション各論－1. 物質使用症	精神科治療学	38	78-83	2023
-------------	--	--------	----	-------	------

令和 6 年 3 月 5 日

厚生労働大臣 殿

機関名 湘南医療大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 大屋敷 英志枝

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 湘南医療大学 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 船田 正彦・フナダ マサヒコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:湘南医療大学 薬学部 動物実験等に関する規程)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	湘南医療大学 薬学部 動物実験委員会	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 湘南医療大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 大屋敷 英志枝

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 湘南医療大学 薬学部・教授
(氏名・フリガナ) 栗原 正明・クリハラ マサアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 岐阜薬科大学
 所属研究機関長 職名 学長
 氏名 原 英彰

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 岐阜薬科大学・薬物動態学研究室・教授
 (氏名・フリガナ) 北市 清幸・キタイチ キヨユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立研究開発法人
国立精神・神経医療研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中込 和幸

次の職員の令和 5 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬物依存研究部・心理社会研究室長

(氏名・フリガナ) 嶋根 卓也 (シマネ タクヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立精神・神経医療研究センター	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人岡山大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 那須 保友

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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

2. 研究課題名 危険ドラッグと関連代謝物の有害作用評価と乱用実態把握に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 学術研究院医歯薬学域・教授

(氏名・フリガナ) 浅沼 幹人・アサマ マサト

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。