

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】

危険ドラッグ N,N-diethyl-5-nitro-2-[(4-propoxyphenyl)methyl]-1H-benzimidazole-1-ethanamine: propoxynitazene (Protonitazene)、2-[(4-ethoxyphenyl)methyl]-N,N-diethyl-1H-benzimidazole-1-ethanamine: etodesnitazene (Etazene)、2-[(4-ethoxyphenyl)methyl]-5-nitro-1-(2-pyrrolidin-1-ylethyl)-1H-benzimidazole: N-pyrrolidino etonitazene (Etonitazepyne)および 1-{2-methyl-4-[(2E)-3-phenylprop-2-en-1-yl]}butan-1-one (2-Methyl-AP-237)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および精神依存性について検討した。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、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 のオピオイド受容体作用を解析した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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: protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 による運動活性に対する影響を検討した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の投与により、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 前処置によって有意に抑制された。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の運動促進作用は、オピオイド受容体を介して発現する作用であ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。Protonitazene、

etazene、etonitazepine および 2-methyl-AP-237 の条件付け（1 日 1 回 6 日間、3：薬物、3：溶媒）を行ったところ、protonitazene、etazene、etonitazepine および 2-methyl-AP-237 においてそれぞれ有意な CPP の発現が確認された。Protonitazene、etazene、etonitazepine および 2-methyl-AP-237 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。

[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 THC 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。（ $R^2=0.978$ ）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。

[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-2]

これまでの検討結果から、モノアミントランスポーター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、さらに昨年度のモノアミントランスポーター（DAT・SERT）を恒常的に発現している非神経細胞 CHO 細胞を用いた危険ドラッグの細胞毒性の検討から、モノアミンの取り込み、貯蔵、放出ができる機構をもつ培養神経細胞株を用いる必要があると考えられた。そこで、今年度は危険ドラッグ/乱用薬物の DAT への作用の有無を評価するために、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/乱用薬物を反応させ、固定後クリック反応でドパミンを蛍光標識することで DAT への競合反応の有無を検出するアッセイ系の構築を試みた。また、マウス線条体の粗膜分画から免疫沈降で得られた DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグ/乱用薬物と反応させ、BEACON により蛍光偏光を測定することにより DAT への結合活性の有無を評価する *in vitro* 評価系の確立についても試みた。CATH.a 細胞を用いてアルキン化ドパミン(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細胞膜上の蛍光陽性シグナルが、濃度依存的に増加することが確認でき、非標識ドパミンの同時添加により抑制されたことから、DAtracer の DAT への作用に対してドパミンが競合していると考えられ、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のアッセイ系を確立できた。また、methyldone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、DAtracer 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。しかし、検出される蛍光シグナルは強くなく一様の変化を示さないものもあり、蛍光シグナル抑制の判断は容易ではなく、定量性に課題が残る。危険ドラッグの DAT 結合活性の BEACON での *in vitro* 評価系の確立については、免疫沈降では十分な DAT 蛋白量を得ることができなかったため、今後リコンビナント DAT 蛋白を用いて検討する。

[研究-4：フェンタニル類似体の代謝挙動とフッ素位置異性体の識別に関する研究]

近年、麻薬であるフェンタニル類似体が危険ドラッグとして海外で流通しており、我が国でもすでに 30 種類以上が規制対象となっている。依然、新規なフェンタニル類似体は合成、流通しており、それらの流通や乱用を防ぐための正確な検出方法の確立が求められている。しかしながら、その位置異性体は製品中における識別や摂取証明が困難である。そこで、本年度は、GC-MS、LC-

MS,LC-MS IT-TOF を用い、フェンタニル類似体である Fluorofranylfentanyl (FFF)をモデルドラッグとしてその位置異性体の測定方法の確立と *in vitro* 代謝実験を実施した。ヒト肝ミクロソームに FFF 位置異性体を添加し、経時的に採取したサンプルを LCMS-IT-TOF にて測定し、代謝物の同定を行った。その結果、親化合物の半減期が 1 時間以内であること、いずれの異性体においても 3 種の第 I 相代謝物 [酸化 N-脱アルキル化体 (M1)、一水酸化体 (M2)、アミド加水分解体 (M3)] の存在することが明らかになった。M1 は主要代謝物であり、3 種の FFF に共通するものであった。一方、M3 は 3 種の位置異性体において分離測定が可能であり、代謝物生成量比でも異性体間で差がみられることが確認された。

[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、高濃度に抽出された THC を含有する大麻ベイプ (リキッド、ワックスなど) の使用実態を明らかにすることを目的した。対象は、福岡県の少年用大麻再乱用防止プログラム (以下、F-CAN と表記) に参加した 17 名の大麻使用少年のうち、研究参加の同意が得られた 12 名であった。過去 1 年以内の大麻ベイプの使用率は、全体の 66.7%であった。大麻ベイプ使用群は、対照群 (非使用者) に比べて、大麻使用開始年齢が若く (ベイプ群 13.3 歳、対照群 15.8 歳)、DAST-20 スコアの平均値が高く (ベイプ群 8.6 点、対照群 3.3 点)、それぞれ有意差が認められた。一方、MINI による薬物依存および薬物乱用の診断には有意差が認められなかった。

結論: (1) 本研究により、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。4 つの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 THC 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 7 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。作成した QSAR 式を用いてカンナビノイド類縁体の 12 化合物のマトリックスを作った。これによりカンナビノイド類縁体の総括規制に供するデータとなり得ると考えられる。(3) 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。methylnone, 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。DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグ/乱用薬物と反応させ、BEACON (蛍光偏光測定) により DAT への結合活性を評価する *in vitro* 評価系については、今後リコンビナント DAT 蛋白を用いて検討する。(4) 本研究より、フェンタニル類似体である FFF では、LC-MS での分離が不可能であるものの、3 種の FFF 位置異性体の分離が GC-MS で行えることが明らかになった。したがって、製品における親化合物の識別には GC-MS が利用可能であることが明らかになった。一方で、FFF 位置異性体はいずれも半減期が短く、FFF の摂取証明には不適であり、代謝物の情報を活用することが必要であることが示唆された。また、FFF 代謝物の解析結

果より、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 FFF に特徴的な主要代謝物である酸化 N-脱アルキル化体の検出が有用であることが示唆された。一方で、3 種の FFF 位置異性体の識別においては 3 つの主要な第 I 相代謝物のうちアミド加水分解体における保持時間の違いと生成量比を活用できることが示された。以上の結果はフェンタニル類似体の識別に資するものであり、国内におけるフェンタニル類似体を含む危険ドラッグの流通の阻止に資すると考えられる。(5) 大麻使用少年の間で、大麻ベイクの使用が着実に広がっている可能性を示唆する結果が得られた。大麻ベイク使用者は、非使用者に比べて、大麻の初回使用年齢が若く、薬物使用関連問題の重症度が高いといった特徴がみられたが、未だ十分なサンプル数が得られておらず、大麻ベイクの使用実態を明らかにするためにはさらなるリクルートが必要である。

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。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、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モノアミントランスポーター阻害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、GC-MS、LC-MS, LC-MS IT-TOF を用いて、フェンタニル類似化合物の *in vitro* 代謝実験を実施し、代謝物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バン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

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。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 protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の薬理学的特性及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) 報酬効果について検討を行った。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、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 のオピオイド受容体作用を解析

した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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：protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 による運動活性に対する影響を検討した。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の投与により、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 前処置によって有意に抑制された。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の運動促進作用は、オピオイド受容体を介して発現する作用であ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。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 の条件付け (1日1回6日間、3:薬物、3:溶媒) を行ったところ、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 においてそれぞれ有意な CPP の発現が確認された。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。

[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¹⁾のうち側鎖の炭素鎖が異なる化合物7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。

$$\begin{aligned} \text{pKi} = & \\ & -3.593867 \\ & +0.009454 * \text{PEOE_VSA-0} \\ & +0.016227 * \text{PEOE_VSA-1} \end{aligned}$$

$$R^2 = 0.978$$

PEOE_VSA-0、PEOE_VSA-1 は MOE の記述子である。この QSAR 式を用いて、活性未知のカンナビノイド類縁体 (Δ^9 -THCB, Δ^9 -THCH, Δ^9 -THCP, Δ^9 -THCjd, Δ^8 -THCV) 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-2]

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

今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、DAT 恒常発現 CHO-DAT 細胞に加えて、ドパミンの取り込み、貯蔵、放出機構をもっている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、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。CHO-DAT細胞にアルキン化ドパミン(DAtracer)を添加・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たところ、アルキン化ドパミンの蛍光は観察できなかった。CATH.a 細胞を用いて、DAtracer を反応させ固定後、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った。DAtracer の濃度依存的に DAT への結合と考えられる細胞膜上の蛍光陽性シグナルが検出され、DAtracer (最終濃度 50 μ M)において最大強度を示した。この DAtracer (50 μ M)での蛍光シグナルは、50 μ M 非標識ドパミン添加により抑制されていた。さらに、DAtracer (50 μ M)の DAT への結合作用に対する 10 種の乱用薬物/危険ドラッグ(各 500 μ M, 1 mM)添加の影響を調べた。2CT-7, harmaline では著明な神経細胞死のために DAtracer の蛍光シグナルが全く観察できなかった。高用量での神経細胞死とともに、methylnone, 4FMP > MDMA > METH, PMMA > PP の順で、DAtracer (50 μ M)の蛍光シグナルが抑制されていた。また、インドールアルカロイド系の 5MeO-DMT と 5MeO-MIPT については、高用量での神経細胞死はみられるものの、DAtracer の蛍光シグナルは一樣の変化はなく、明らかな減退はみられなかった。

なお、このクリック反応による DAT に結合した DAtracer の蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡では検出できるものの、蛍光マイクロプレートリーダーによる蛍光強度測定で測定できるほど強いものではなかった。

また、培養細胞や動物などを用いない *in vitro* 評価系を確立することを目指して、マウス線条体の粗膜分画から DAT 抗体による免疫沈降で得られた DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグあるいは類似関連化合物と反応させ、BEACON により蛍光偏光を測定することにより DAT への結合活性の有無を評価する *in vitro* 評価系の確立についても試みた。しかし、線条体粗膜分画から得られた DAT 蛋白は非常に少なくアッセイ系を確立することはできなかった。

[研究-4: フェンタニル類似体の代謝挙動とフッ素位置異性体の識別に関する研究]

北市清幸

岐阜薬科大学

薬物動態学研究室 教授

危険ドラッグおよび代謝物の測定には TRACE 1310 GC/ISQ LT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、LCMS-8045 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto)、LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto)を使用した。フェンタニル類似体 FFF の異性体である *o*-fluorofuranylfentanyl (*o*-FFF)、*p*-fluorofuranylfentanyl (*p*-FFF)、*m*-fluorofuranylfentanyl (*m*-FFF)は岐阜県保健環境研究所で合成され、NMR にてその純度がほぼ 100%であるものを使用した。

ヒト肝マイクロソーム (HLMs) を用いた代謝実験は FFF を添加し、経時的にサンプルを採取して行った。得られた代謝物は上記の機器 (主に LCMS-IT-TOF) で測定を行った。その結果、FFF 位置異性体の識別は LC-MS/MS では各種カラムを使用しても困難であったが、GC-MS では 3 種の位置異性体が識別可能であることが明らかになった。HLMs を用いた *in vitro* 代謝実験では親化合物の半減期が 1 時間以内であることいずれの異性体においても 3 種の第 I 相代謝物 [酸化的 N-脱アルキル化体 (M1)、一水酸化体 (M2)、アミド加水分解体 (M3)] が存在すること、M1 は主要代謝物であり、3 種の FFF に共通するものであること、M3 は 3 種の位置異性体において分離測定が可能であり、代謝物生成量比でも異性体間で差がみられることが確認された。

[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、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 2023 年 1 月までの間に、計 17 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 12 名より研究参加の同意を得た（同意取得率 70.6%）。本研究ではこの 12 名を分析対象者とした。

過去 1 年以内の大麻ベイクの使用歴に基づき、対象者をベイク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。

過去 1 年以内の大麻ベイクの使用率は、全体の 66.7%であった。大麻ベイク使用群は、対照群（非使用者）に比べて、大麻使用開始年齢が若く（ベイク群 13.3 歳、対照群 15.8 歳）、DAST-20 スコアの平均値が高く（ベイク群 8.6 点、対照群 3.3 点）、それぞれ有意差が認められた。一方、MINI による薬物依存および薬物乱用の診断には有意差が認められなかった。

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、protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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。Protonitazene、etazene、etonitazepyne および 2-methyl-AP-237 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 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-2

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、CATH.a 細胞を用いて、アルキン化ドパミン(DAtracer)を生細胞に反応させ DAT に結合、取り込みさせた後に固定し、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 DAT への結合と考えられる細胞膜上の蛍光陽性シグナルが、濃度依存的に増加することが確認でき、さらに非標識ドパミンあるいはフェネチルアミン系、ピペラジン系

のドラッグ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 への作用に対してこれらの乱用薬物/危険ドラッグが競合拮抗作用を有していると考えられ、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のアッセイ系を確立できたと考えた。この方法では蛍光強度測定ができるほどの強い蛍光がみられるわけではなく、蛍光シグナル抑制の判断は必ずしも容易ではないことから、定量性に問題があるといわざるを得ない。

DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグ/乱用薬物と反応させ、BEACON (蛍光偏光測定) により DAT への結合活性を評価する *in vitro* 評価系については、十分な DAT 蛋白量を得るために今後リコンビナント DAT 蛋白を用いて検討する。

4. フェンタニル類似体の代謝挙動とフッ素位置異性体の識別に関する研究

本研究結果より、製品における 3 種の FFF 位置異性体の親化合物の識別には GC-MS の利用可能であることが明らかになった。一方で、FFF 位置異性体はいずれも半減期が短く、FFF の摂取証明には親化合物ではなく、代謝物の情報を活用することが必要であることが示唆された。さらに、FFF 代謝物の解析結果より、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 FFF に特徴的な主要代謝物である M1 の検出が有用であること、3 種の FFF 位置異性体の識別においては M3 の保持時間の違いと生成量比を活用でき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

若年の大麻使用者の多くが、友人や仲間との付き合いの中で、大麻使用を開始していることが、これまで繰り返し指摘されてきた。低年齢で大麻に曝露されることは、そういった大麻を使う仲間との交流機会がより増えることにも

つながる。大麻を使う仲間との交流の中で、大麻パイプを使う機会も一緒に増えた可能性がある。また、大麻パイプ使用群が抱えている問題は、精神医学的な依存症の問題というよりも、それ以外の大麻使用に伴う友人関係や家族関係、あるいは学校関係といった心理社会的な問題の方が中心となっている可能性が示唆された。

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 7 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 式を用いてカンナビノイド類縁体の 12 化合物のマトリックスを作った。これによりカンナビノイド類縁体の総括規制に供するデータとなると考えている。

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。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。しかし、検出される蛍光シグナルは強くなく一様の

変化を示さないものもあり、蛍光シグナル抑制の判断は容易ではなく、定量性に課題が残る。

線条体の粗膜分画から免疫沈降で得られた DAT 蛋白を蛍光標識し、危険ドラッグ/乱用薬物と反応させ、BEACON（蛍光偏光測定）により DAT への結合活性を評価する *in vitro* 評価系の確立も試みたが、蛍光を検出できるほどの DAT 蛋白量を得ることができなかった。今後リコンビナント DAT 蛋白を用いた BEACON アッセイ系の確立を検討する。

危険ドラッグの代謝プロファイルに関する研究では、フェンタニル類似体の厳密な識別の基盤となる有用な情報を得ることができた。本データは、我が国におけるフェンタニル類似体を含む危険ドラッグの規制によるまん延防止に貢献すると考えられる。

大麻使用少年の間で、大麻パイプの使用が着実に広がっている可能性を示唆する結果が得られた。大麻パイプ使用者は、非使用者に比べて、大麻の初回使用年齢が若く、薬物使用関連問題の重症度が高いといった特徴がみられた。未だ十分なサンプル数が得られておらず、大麻パイプの使用実態を明らかにするためには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、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。

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) 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
- 4) Yuyama M, Misawa T, Demizu Y, Kanaya T, Kurihara M.: Design and synthesis of novel estrogen receptor antagonists with acetal containing biphenylmethane skeleton: *Results in Chemistry*, 3, 2021, 100124
- 5) Moriya S, Shibasaki H, Kohara M, Kuwata K, Imamura, Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T: Synthesis and characterization of PNA oligomers containing preQ1 as a positively charged guanine analogue: *Bioorg Med Chem Lett.* 2021, 39, 127850
- 6) Imafuku, F., Miyazaki, I., Sun, J., Kamimai, S., Shimizu, T., Toyota, T., Okamoto, Y., Isooka, N., Kikuoka, R., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Central and enteric neuroprotective effects by *Eucommia ulmoides* extracts on neurodegeneration in rotenone-induced parkinsonian mouse. *Acta Med. Okayama*, 2022, 76(4): 373-383. doi: 10.18926/AMO/63889
- 7) Takahashi M, Yamaki M, Kondo A, Hattori M, Kobayashi M, Shimane T: Prevalence of adverse childhood experiences and their

- association with suicidal ideation and non-suicidal self-injury among incarcerated methamphetamine users in Japan. *Child Abuse & Neglect* 131: 105763-105763, 2022.
- 8) 服部真人, 小林美智子, 高橋哲, 高岸百合子, 大宮宗一郎, 谷真如, 嶋根卓也: 覚醒剤使用の引き金に関する実証的研究—薬物依存と他のアディクションの併存に焦点を当てて—. *日本アルコール・薬物医学会誌* 57(3):127-142 2022.
 - 9) 山田理沙, 嶋根卓也, 近藤あゆみ, 米澤雅子, 松本俊彦: 薬物依存症回復支援施設の利用者を対象とした物質使用とHIV感染リスクの高い性行動に関する研究. *日本エイズ学会誌* 24(3): 89-97, 2022.
 - 10) 服部真人, 小林美智子, 高橋哲, 高岸百合子, 大宮宗一郎, 谷真如, 嶋根卓也: 薬物依存と他のアディクションが併存する覚醒剤事犯者の特徴. *犯罪心学研究* 60(1): 1-15, 2022.
 - 11) 新田慎一郎, 嶋根卓也, 猪浦智史, 近藤あゆみ, 米澤雅子, 松本俊彦: 覚醒剤使用に問題を抱えるゲイ・バイセクシュアル男性の特徴 —ヘテロセクシュアル男性との比較から—. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 57(5): 182-192, 2022.
 - 12) 嶋根卓也: 市販薬乱用とセルフメディケーション. *精神科治療学* 37(7) :793-797, 2022.
 - 13) 嶋根卓也: コロナ禍における薬物使用の動向: 薬物使用に関する全国住民調査 2021 より. *Newsletter KNOW (麻薬・覚せい剤乱用防止センター)* 第 107 号: 2-6, 2022.
 - 14) 嶋根卓也: OTC 薬乱用の現状と対応—最も身近な医薬品の意外な落とし穴. *日本医事新報* No.5133 : 18-34, 2022.
 - 15) 嶋根卓也: 「助けて」という気持ちをクスリと一緒に飲み込んでしまう. *こころの科学* 226 : 71-75, 2022.
 - 16) 嶋根卓也: 若年者における薬物乱用の理解と課題. ダメ、ゼッターで終わらせない薬物乱用防止教育. 令和 4 年度全国学校保健・安全研究大会 課題別研究協議会:114-117, 2022.
 - 17) 嶋根卓也: 20.物質使用障害. 医療者のためのLGBTQ 講座 (総編集: 吉田絵理子), 南山堂, 東京, 2022.
- ## 2. 学会発表
- 1) 舩田正彦: 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) 富澤宰菊, 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, 夏莉英昭, 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 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, 舩田正彦, 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ER α アンタゴニストの創製: *日本薬学会*第142年会 (2022/03/28)
 - 5) 栗原正明 (招待講演): 核内受容体に作用する薬物分子の創製: 第50回構造活性相関シンポジウム (2022/11/10-11, 名古屋)
 - 6) 荒井裕美子, 湯山円晴, 市丸嘉, 佐藤忠章, 栗原正明: QSARによる危険ドラッグのインシリコ活性予測: 第50回構造活性相関シンポジウム (2022/11/10-11, 名古屋)
 - 7) 正井加織, 中山裕太, 宮崎育子, 浅沼幹人: ストレプトゾトシン脳室内投与による孤発性アルツハイマー病モデルマウスの行動学的・組織学的検討. 第 31 回神経行動薬理若手研究者の集い, 福岡 (オンライン), 2022.3.6.
 - 8) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 村上真樹, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 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ロテノン誘発ドパミン神

- 経障害. 第 95 回日本薬理学会年会, 博多 (オンライン), 2022.3.7.
- 9) 宮崎育子, 菊岡 亮, 磯岡奈未, 村上真樹, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: 農薬ロテノン曝露による部位特異的アストロサイト-ミクログリア相互連関とドパミン神経細胞への影響. 第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会, オンライン, 2022.3.28.
 - 10) Miyazaki, I., Kikuoka, R., Isooka, N., Murakami, S., Sogawa, C., Sogawa, N., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Region-specific astrocyte-microglia interaction promotes rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity, 第 63 回本神経学会学術大会, 東京, 2022.5.18.
 - 11) 宮崎育子, 西山千春, 菊岡 亮, 名越 武, Kyle Quin, 禅正和真, 浅沼幹人: 妊娠・授乳期エポキシ樹脂 BADGE 曝露による新生仔マウス脳発達異常におけるエストロゲン受容体 β の関与. 第 49 回日本毒性学会学術年会, 札幌, 2022. 7. 1.
 - 12) 浅沼幹人, 宮崎育子, 都 明希, 小林壯太郎, 津田光希, 小野鈴香, 正井加織: 農薬ロテノン慢性皮下投与パーキンソン病モデルマウスにおける腸管細胞環境の変化. 第 49 回日本毒性学会学術年会, 札幌, 2022. 7. 2.
 - 13) Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Targeting zinc-binding protein metallothionein in astrocytes for dopaminergic neuroprotection. The 8th International Symposium on Metallomics, Kanazawa, Japan, 2022.7.12.
 - 14) 宮崎育子, 小林壯太郎, 津田光希, 都 明希, 小野鈴香, 正井加織, 浅沼幹人: パーキンソン病の脳腸病態を再現しうるモデル動物における腸管神経障害機構の検討. 第 16 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 東京, 2022. 7. 22.
 - 15) 宮崎育子, 正井加織, 進 浩太郎, 十川千春, 十川紀夫, 北村佳久, 浅沼幹人: パーキンソン病の脳腸病態を再現しうるモデル動物におけるメタロチオネイン発現変化. メタルバイオサイエンス研究会 2022, 京都, 2022. 10. 19.
 - 16) 西田優花, 嶋田勝光, 十川千春, 宮崎育子, 富田美穂子, 靱島弘之, 浅沼幹人, 村上 聡, 十川紀夫: 抜歯後組織修復におけるメタロチオネインの関与. メタルバイオサイエンス研究会 2022, 京都, 2022. 10. 20.
 - 17) 浅沼幹人, 宮崎育子, 進 浩太郎, 都 明希, 正井加織, 小林壯太郎, 津田光希, 小野鈴香: パーキンソン病の脳・腸神経変性を再現できるロテノン曝露モデルマウスにおける腸管細胞環境の変化. 第 96 回日本薬理学会年会, 横浜, 2022. 12. 2.
 - 18) 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: パーキンソン病モデルにおける α シヌクレイン発現と神経変性へのグリア細胞部位特異性の関与. 第96回日本薬理学会年会, 横浜, 2022. 12. 2.
 - 19) 森川美空: 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/ハイブリッド, 2022年3月25-28日
 - 20) 北市 清幸, 松尾 桃花, 山崎里桜, 森理人, 伊藤秀, 田外秀俊, 曾田翠, 兒玉幸修, 佐々木均. 乱用抵抗性製剤開発ガイドライン案の作成に向けた各種製剤学的 *in vitro* 試験法の実施. 2022年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 仙台/ハイブリッド, 2022年9月8-10日.
 - 21) 伊藤宏輔: 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. BPCNP/PPP4学会合同年会. 東京, 2022年11月4-6日
 - 22) Y. Oida, M. Morikawa, K. Itoh, K. Iwai, T. Iwaki, M. Soda, H. Shimizu, H. Tanaka, N. Shinoda, K. Kitaichi. The establishment of the method to differentially identify the isomers of a fentanyl analogue, fluorofuranylfentanyl. CINP 2023. Montreal, May 6-10, 2023.
 - 23) Shimane T., Funada M, Tomiyama K,

- Matsumoto T: Increase in Abuse of Over-the-counter Drugs Including Opioids Such as Dihydrocodeine in Japan. The 2nd International Forum on Drug Policy, Shanghai, China, 2022. 8.4. (Best Paper Award)
- 24) Shimane T: Current Situation and Response to Over-the-Counter Drug Abuse in Japan. International symposium on prevention and counseling of drug abuse for juveniles. National Chung Cheng University, Taiwan, 2022.11.2.
- 25) Shimane T: Understanding and support for marijuana using youth in Japan. 2022 Drug Control Cross-network Innovation as Scientific and Technological Intelligence Drug Prevention Achievements Publication and International Symposium, Taiwan, 2022.11.4.
- 26) 嶋根卓也：法務総合研究所との共同研究による支援者向けの小冊子の作成：覚醒剤事犯者の理解とサポート 2021. シンポジウム 10 覚醒剤事犯者の理解とサポート(3). 2022 年度日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，宮城，2022.9.9.
- 27) 嶋根卓也：高校生における大麻使用状況と大麻使用少年の心理社会的特徴：薬物使用と生活に関する全国高校生調査 2018 より. シンポジウム 13 大麻使用少年の理解とサポート(1). 2022 年度日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，宮城，2022.9.10.
- 28) 嶋根卓也：覚醒剤使用者における危険な性行動：覚醒剤事犯者を対象とする全国調査より. シンポジウム 15 物質使用と性感染症・性行動・セクシュアリティ(1). 2022 年度日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，宮城，2022.9.10.
- 29) 引土絵未，嶋根卓也，小高真美，秋元恵一郎，大吉 努，加藤 隆，栗坪千明，山村りつ，吉野美樹，松本俊彦：薬物依存症者の就労支援のあり方に関する研究：インタビュー調査から. 2022 年度日本アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会，宮城（オンライン），2022.9.9.
- 30) 中島美鈴，児玉臨，森治美，嶋根卓也：身近な人とのコミュニケーションスキルに焦点づけた少年用大麻再乱用防止プログラムの作成(1)．第 22 回認知療法・認知行動療法学会，東京，2022.11.12.

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