

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名： (日本語) 危険ドラッグを中心とした中枢神経系に作用する物質の
迅速検出方法の開発に関する研究
(英語) Study on development of a quick method of detecting
new psychoactive substances.

研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
依存性薬物研究室 室長 船田 正彦
(英語) Masahiko Funada, Section chief, section of addictive drugs research,
National Center of Neurology and Psychiatry

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 開発課題名： (日本語) 危険ドラッグ検出のためのシステム構築
(英語) System construction for detecting new psychoactive substances

研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
依存性薬物研究室 室長 船田 正彦
(英語) Section chief, section of addictive drugs research,
National Center of Neurology and Psychiatry

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では、危険ドラッグ作用発現に関与する標的タンパク質を培養細胞に強制発現させ、強制発現細胞を利用した危険ドラッグ検出の可否を検証した。また、細胞抽出成分を利用した発色系検出キットの開発を試みた。

危険ドラッグ検出用機能タンパク質発現細胞の構築

(1) 合成カンナビノイド検出用の細胞（CHO-CB1 細胞）、セロトニン受容体作用薬検出用の細胞（CHO-5HT2A 細胞）を樹立した。流通している危険ドラッグ製品を検査対象として、CHO-CB1 細胞および CHO-5HT2A 細胞を利用して、蛍光強度の変化を指標に検査を実施した。40 種類の危険ドラッグ製品を検討し、合成カンナビノイドおよびセロトニン受容体作用薬が検出された。本細胞利用による検出結果は、機器分析の検出結果と一致し、検出用の細胞として利用できることを確認した。また、CHO-CB1 細胞および CHO-5HT2A 細胞を利用して、マウス尿中および血中の合成カンナビノイドおよびセロトニン受容体作用薬の検出を試みたが、未変化体であれば生体サンプルからの検出も可能であった。機能タンパク質発現細胞を利用する危険ドラッグの検出手法は、製品中および生体サンプル検出へも応用可能であり、有用であることが判明した。

(2) PCP 様幻覚薬の作用点である N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸 (NMDA) 受容体をターゲットとして、検出用の細胞（HEK-NR2B 細胞）を樹立した。HEK-NR2B 細胞を利用して、自動パッチクランプ法により NMDA 受容体イオンチャネル活性を検証し、機能評価を行った。PCP やケタミンなどの幻覚薬は、NMDA 受容体機能を低下させることで作用が発現することが明らかになっている。そこで、グルタミン酸刺激による NMDA 受容体のイオンチャネル活性増加に対する PCP およびケタミンの影響を検討したところ、濃度依存的な抑制が確認された。HEK-NR2B 細胞を利用した自動パッチクランプ法による解析は、PCP 様幻覚薬を検出する手法として利用可能である。今後は、HEK-NR2B 細胞の発現安定性の向上、および自動パッチクランプ法による解析精度の検証が必要である。

簡易検出キット(プロトタイプ)

CHO-CB1 細胞および CHO-5HT2A 細胞を大量培養し、受容体タンパク質を抽出して抗原抗体反応を利用した発色系簡易検出キットのプロトタイプを開発を行った。ELISA 法用のプレートに固相化して、発色試薬による競合アッセイを実施した。合成カンナビノイド 10 種類、セロトニン受容体作用薬 2 種類について検討したところ、薬物が存在することで発色強度が低下し、その検出が可能であった。外部機関（衛生研究所および大学）に配布し実用化に向けた問題点について検証した。その結果、検出プレート素材の違いにより検出感度が影響を受けることが明らかとなった。特に、複数の危険ドラッグが含まれる場合に影響が大きいことが判明し、1 ステップで分離精製する工程を考案する必要がある。

総括

細胞による検出：カンナビノイド CB1 受容体発現細胞、5HT2A 受容体発現細胞、NMDA 受容体発現細胞による危険ドラッグ検出手法は、(1) 作用が発現する危険ドラッグ（受容体に作用）を選択的に検出できること、(2) 生体からの検出も可能であることから、「危険性の予測」の観点から有用な方法であることが判明した。細胞からの抽出成分による発色系簡易検出法は、薬物の抽出方法等の改良が必要であるが、一時スクリーニングとして利用できることが期待される。

In this study, we made target proteins that forcibly manifest the action of new psychoactive substances (NPS) in cultured cells and verified the feasibility of detecting NPS using forcibly manifested cells. We also tried to develop a detection kit of a color development system that uses cell-extraction ingredients.

Configuration of cells in which functional proteins for detecting NPS are manifested

(1) We established cells for detecting synthetic cannabinoids (CHO-CB1 cells) and serotonin receptor agents (CHO-5HT2A cells). We inspected NPS products being marketed using CHO-CB1 cells and CHO-5HT2A cells with the change in fluorescence intensity as the index. We examined 40 NPS products and synthetic cannabinoids and detected serotonin receptors from them. The result of detection using these cells accorded with the result of detection from instrumental analysis, confirming that these cells are useful for detection. Furthermore, when we tried to detect synthetic cannabinoids and serotonin receptor agents in mouse urine and blood using CHO-CB1 cells and CHO-5HT2A cells, we found that unaltered bodies can also be detected from biological samples. The NPS detecting technique that utilizes functional protein manifesting cells can also be applied to detection in products and biological samples and thus is useful.

(2) We established a detection cell (HEK-NR2B cell) by targeting the N-methyl-D-aspartate-type glutamic acid (NMDA) receptor, which is the working point of PCP-like hallucination drugs. Using HEK-NR2B cells, we verified the ion-channel activity of the NMDA receptor by the automatic patch clamp method, evaluated its functions, and clarified that the actions of hallucinogenic drugs, such as PCP and ketamine, are manifested because they lower the functions of the NMDA receptor. Therefore, we examined the influences of PCP and ketamine on the augmentation of the ion-channel activity of the NMDA receptor caused by the stimulus of glutamic acid and confirmed a concentration-dependent suppression effect. Analysis by the automatic patch clamp method that uses the HEK-NR2B cell can detect PCP-like hallucination drugs. It is now necessary to improve the stability of manifestation in the HEK-NR2B cell and verify the accuracy of analysis by the automatic patch clamp method.

Simplified detection kit (Prototype)

We developed a prototype of a simplified detection kit of a color development system that utilizes the antigen-antibody reaction by cultivating a large volume of CHO-CB1 cells and CHO-5HT2A cells and then extracting receptor proteins from them. We implemented a competitive assay with a color reagent by making it solid phase on a plate for the ELISA method. As a result of examining 10 synthetic cannabinoids and two serotonin receptor agents, we could detect drugs as color development intensity decreased when they existed. The kit was distributed to external organizations (institutes for health and universities) for review of any problems before its practical use. It was thus clarified that detection sensitivity is highly influenced by the differences in the materials of detection plates. The influence was particularly high when multiple NPSs are contained, so it is necessary to develop a process to separate and refine in one step.

Detection using cells: The NPS detection method that uses cannabinoid CB1 receptor manifestation cells, 5HT2A receptor manifestation cells, and NMDA receptor manifestation cells was useful for predicting the risk because it enables (1) selective detection of NPS that the action manifests (act on the receptor) and (2) detection of NPS from biological bodies. The simplified detection method of the color development system that uses cell-extraction ingredients can be utilized for primary screening, though some improvement of the drug extraction method is necessary.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 8 件、国際誌 1 件）

1. 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用：基礎研究からみた人体への影響. 医学のあゆみ 2015, 254(2), 159-162.
2. 船田正彦. 危険ドラッグの成分と薬理. 日本臨床. 2015, 73(9), 1487-1490.
3. 船田正彦. 危険ドラッグ:その急性中毒と依存性について. 医薬ジャーナル. 52(2), 2016, 635-639.
4. 船田正彦. 危険ドラッグの薬物依存性と細胞毒性：基礎研究から探るその正体.薬学雑誌. 2016, 136, 65-72.
5. 船田正彦. 危険ドラッグの薬理作用と毒性. 日本病院薬剤師会雑誌. 2016, 52(8), 999-1001.
6. 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用 薬理学研究から探るその正体.メディカル朝日. 2016, 45(6), 30-31.
7. 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用-依存性と細胞毒性. 脳 21. 2016, 19 (1), 43-46.
8. 船田正彦. 「危険ドラッグの基礎知識」講談社サイエンティフィク. 2016.
9. Kaizaki-Mitsumoto A, Noguchi N, Yamaguchi S, Odanaka Y, Matsubayashi S, Kumamoto H, Fukuhara K, Funada M, Wada K, Numazawa S.. Three 25-NBOMe-type drugs, three other phenethylamine-type drugs (25I-NBMD, RH34, and escaline), eight cathinone derivatives, and a phencyclidine analog MMXE, newly identified in ingredients of drug products before they were sold on the drug market. Forensic Toxicol 2016, 34, 108-114.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 危険ドラッグを知る：薬物依存性・毒性ならびにその法規制. 口頭, 船田正彦. 第 13 回交通における安全と産業衛生の研究会. 2015/5/14,国内.
2. Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors. 口頭 Funada, M., Tomiyama, K., Wada, K.: College on problems of drug dependence (CPDD) 77th Annual scientific meeting, 2015/6/15 海外.
3. 日本における危険ドラッグ乱用の蔓延について：合成カンナビノイドの薬理学的特性とその有害作用. 「合成カンナビノイドを考えるー薬理・毒性、代謝から法規制までー」口頭, 船田正彦.日本法中毒学会第 34 年会. 2015/6/27,国内.
4. 危険ドラッグの有害作用とその法規制. 口頭, 船田正彦.日本薬学会「生体機能と創薬シンポジウム 2015」教育講演. 2015/8/27,国内.
5. 危険ドラッグ乱用による有害作用：合成カンナビノイド基礎研究からの知見. 口頭, 船田正彦. 平成 27 年度 アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 日本アルコール薬物医学会.シンポジウム「危険ドラッグはどうなった？乱用実態・危険性・その検出」2015/10/12,国内.
6. 危険ドラッグの乱用について. シンポジウム「これからの学校における薬物乱用防止教育の在り方」口頭, 船田正彦.平成 27 年度日本学校保健会. 2016/2/18,国内.
7. 危険ドラッグの有害作用：薬理学研究から探るその正体「教育セミナー. 危険ドラッグの薬理学と規制」口頭, 船田正彦.第 89 回日本薬理学会年会. 2016/3/11,国内.

8. Expression of the cannabinoid CB1 receptor in Chinese hamster ovary cells: a specific cellular model to investigate the acute and chronic effects of synthetic cannabinoids. ポスター, Funada, M., Tomiyama, K.: College on problems of drug dependence (CPDD) 78th Annual scientific meeting, 2016/6/13 海外.
9. 危険ドラッグ成分 AB-CHMINACA における代謝物活性の評価. 口頭, 古川諒一, 曾田翠, 神山恵理奈, 多田裕之, 伊藤哲朗, 船田正彦, 北市清幸: 日本法中毒学会第 35 年会 2016/7/1. 国内.
10. 薬物乱用のトレンド: 依存性薬物の有害作用とその法規制. 口頭, 船田正彦. 第 90 回日本薬理学会年会. 2017/3/17, 国内.
11. 合成カンナビノイドによる痙攣発現機構の解明. ポスター, 竹林美佳, 船田正彦. 第 90 回日本薬理学会年会. 2017/3/17, 国内.
12. NMDA 受容体発現細胞による幻覚薬作用評価. ポスター, 岩野さやか, 船田正彦. 第 90 回日本薬理学会年会. 2017/3/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし。

(4) 特許出願
なし。