

違法ドラッグ生体影響試験の開発

佐藤 かな子，福森 信隆，野中 良一，不破 達，田中 豊人

Development of Assay Systems to Detect and Evaluate the Biological Effects of (Potentially) Illegal Drugs

Kanako SATOH, Nobutaka FUKUMORI, Ryuichi NONAKA, Tatsu FUWA and Toyohito TANAKA

違法ドラッグ生体影響試験の開発

佐藤 かな子*, 福森 信隆*, 野中 良一*, 不破 達*, 田中 豊人*

違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の乱用は、使用者の健康被害にとどまらず、傷害事件を誘発するなど、大きな社会問題となっている。東京都は平成17年（2005）年、国に先駆けて「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を制定し、これまでに9種類のドラッグを知事指定薬物に指定した。東京都健康安全研究センターでは、ドラッグを知事指定薬物とするために必要な、ドラッグの危険性に関する情報の分析及び評価資料の一つとして、ドラッグの構造決定、純度試験、動物へ投与した際の行動および神経症状観察、中枢神経系への影響を調べ、その結果を科学的根拠に基づくドラッグの評価資料として提供している。本総説では、ドラッグの生体影響を調べるために開発した*in vitro*および*in vivo*スクリーニング法を紹介すると共に、これらの方法で調べたドラッグの作用について報告する。

キーワード: 違法ドラッグ, 行動, 神経症状, 神経伝達物質, 再取り込み阻害作用, 遊離促進作用, G-タンパク結合作用, マイクロダイアリス, 自発行動, 小動物行動測定装置

1. 違法ドラッグに対する東京都の取り組み

健康安全部薬事監視課では、健康被害の未然防止、犯罪の防止及び薬物乱用防止等の目的で、1996年から都内のアダルトショップ、ビデオ店、ドラッグ専門店等から違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）を試買し、東京都健康安全研究センター（以下都健安研と略す）で、ドラッグの含有成分に関して試験検査を行なっている。その結果、医薬品成分が検出された製品を取り扱っていた店舗には、製品の販売中止、回収等の指示を行い、都民に製品の危険性を周知させるため、報道公表を行なってきた。しかし、インターネットや路上における販売はあつと絶たず、違法ドラッグ使用による傷害事件や健康被害が頻発し、さらに、これらドラッグの使用は、覚せい剤や麻薬等の乱用への入り口となることが危惧されていた。そこで東京都は、2005年4月1日に「東京都薬物の濫用防止に関する条例」¹⁾を施行し、4回に渡り、9種類のドラッグ2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine (以下2C-Iと略す), *N*-isopropyl-1-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)-*N*-methylethan-2-amine (以下5-MeO-MIPTと略す), *N*-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)butan-2-amine (以下MBDBと略す), 1-(3-chlorophenyl)piperazine (以下3CPPと略す), 1-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)propan-2-amine (以下5-MeO-AMTと略す), 1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-amine (以下TMA-2と略す), 2-(4-ethylthio-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine (以下2C-T-2と略す), 1-(4-methoxyphenyl)-*N*-methylpropan-2-amine (以下PMMAと略す), 2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)propan-1-one (以下methyloneと略す)を知事指定薬物²⁾とし、取締りをおこなってきた。この条例において「知事指定薬物」とは、「大麻取締法、覚せい剤取締法、麻薬及び向精神薬取締法、あへん法、毒物及び劇物取締法施行令で規制する薬物を除くもののうち、これらと同等に、興

奮、幻覚、陶酔その他これらに類する作用を人の精神に及ぼす物で、それを乱用することにより人の健康に被害が生じると認められるものである。」と定義している。また、この条例の特徴は、ドラッグの販売ばかりでなく、授与の目的での所持や広告、使用することを知って場所を提供あるいは斡旋することについても規制できるところにある。この東京都の取り組みを受けて、国は知事指定薬物9種類のうち4種類（MBDB, 3CPP, TMA-2, methylone）を順次麻薬へ指定し、さらに2007年4月1日に違法ドラッグを指定薬物として規制するための「薬事法の一部を改正する法律」³⁾を施行した。その結果、残る5種類が薬事法指定薬物（さらに2008年1月に2C-Iと2C-T-2を麻薬指定）となり、知事指定薬物9種類がすべて法律により全国的に規制されることとなった。薬事法指定薬物とは、「中枢神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚的作用（当該作用の維持又は強化の作用を含む。）を有する蓋然性が高く、かつ、人の体に使用された場合に保健衛生上の危害が発生するおそれがある物」として、厚生労働大臣が指定する物質である。

東京都では、ドラッグの危険性に関する情報について調査を行い、その結果を知事に報告するための付属機関として、東京都脱法ドラッグ専門調査委員会（以下委員会と略す）¹⁾を設置した。委員会ではドラッグの構造や神経伝達物質の動態、動物での行動や神経症状などから、ヒトでの作用を推測しドラッグを評価している。都健安研では、ドラッグの危険性に関する情報の分析及び評価をするために必要なドラッグの純度試験、構造決定、中枢神経系への影響を調べ、委員会に基礎的データとして提供している。

2. 実施している違法ドラッグのスクリーニング試験

違法ドラッグによる、多幸感や高揚感、幻覚等の作用を

* 東京都健康安全研究センター環境保健部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

症状として、実験動物において明確に確認することは通常難しいが、著者等はドラッグの中枢神経系への影響を調べるために、*in vivo*および*in vitro*のスクリーニング系の構築を試みた。行動薬理学は、精神作用を含めて実験動物が現す行動や神経症状を観察することでヒトでの神経系への作用を類推することが可能である⁴⁾。未規制である新規ドラッグについては、実験動物で行動および神経症状を分類することが重要であるため、この行動薬理学を応用し、ドラッグが実験動物の行動および神経症状に及ぼす作用を迅速で簡明かつ客観的に評価するためのスクリーニング試験法を開発した。さらに、ドラッグの中枢神経作用を検討する際に、ヒトへの影響を類推するためには、動物を使った行動指標を客観的な数値データとして量的に測定することが極めて

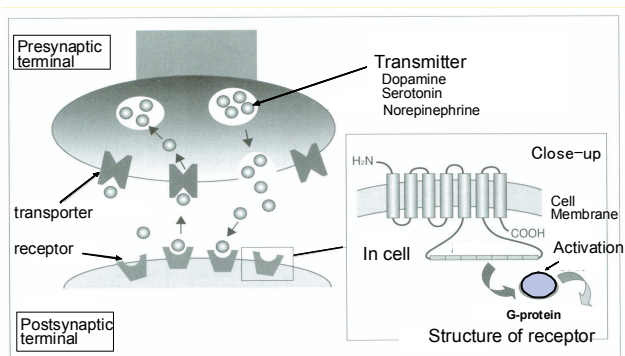


Fig. 1. Actions of assessed drugs in pre- and post synaptic terminals¹⁴⁾

重要である。我々は、これまでにマウスを用いた漢方製剤の行動薬理試験^{5,6)}や食品添加物などの行動発達毒性試験^{7,8)}などで、近赤外線を用いた小動物行動測定装置により比較的短時間の探索行動を測定してきたが、この装置でマウスを用いたドラッグの生体影響試験を行う方法について検討した。

ドラッグの中枢神経作用は広範囲であり、中枢神経系への作用を特定する方策也多岐に渡っている。⁹⁻¹¹⁾神経伝達を司るニューロンに対する作用を前シナプス側及び後シナプス側に分けて考えると、ドラッグは、前シナプス側において、神経伝達物質であるドーパミン（以下DAと略す）、セロトニン（以下5-HTと略す）、ノルエピエフリン（以下NEと略す）のシナプス間隙での濃度を増加させることにより興奮作用をもたらす。一方、後シナプス側では、ドラッグが直接受容体と結合し、グアニンヌクレオチド結合タンパク質（以下G-タンパクと略す）を活性化することにより作用を発揮すると考えられている（Fig. 1）。そこで、ラット脳から調製したシナプス画分を用い、ドラッグの前シナプス側における伝達物質の再取り込み阻害作用及び遊離促進作用と、後シナプス側におけるG-タンパク活性化作用をそれぞれ測定する簡便な*in vitro*スクリーニング法を開発した。¹²⁻¹⁴⁾また、覚せい剤methamphetamine（別名エス、スピード等、以下MAPと略す）や合成麻薬である3,4-methylenedioxy methamphetamine（別名エクスタシー、以下MDMAと略す）の作用は、この*in vivo*や*in vitro*スクリーニング法だけでなく、

Table 1. Characteristics of assessed drugs

Drugs	Abbreviations	Purity (%)	Control Law ^{a)}
Phenethylamines			
3,4-methylenedioxymethamphetamine	MDMA	98.0	N.C.L. ^{b)}
2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)propan-1-one	Methylone	98.8	N.C.L.
1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butan-2-amine	BDB	97.1	P.A.L. ^{c)}
N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)butan-2-amine	MBDB	99	N.C.L.
1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one	MDPV	80	P.A.L.
2-(4-chloro-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine	2C-C	94.2	P.A.L.
2-(4-ethyl-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine	2C-E	100	P.A.L.
2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine	2C-I	99.1	N.C.L.
3,4,5-trimethoxyamphetamine	TMA	99.3	N.C.L.
1-(2,4,5-trimethoxyphenyl)propan-2-amine	TMA-2	98.6	N.C.L.
1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)propan-2-amine	TMA-6	98.1	P.A.L.
1-(4-methoxyphenyl)-N-methylpropan-2-amine	PMMA	96.3	P.A.L.
1-(4-fluorophenyl)propan-2-amine	4FMP	>98	P.A.L.
methamphetamine	MAP	>99.9	S.C.L. ^{d)}
Tryptamines			
3-(2-aminopropyl)indol	AMT	99.0	N.C.L.
1-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)propan-2-amine	5-MeO-AMT	92.7	P.A.L.
N,N-dipropyltryptamine	DPT	96.9	P.A.L.
3-[2-(diisopropylamino)ethyl]-5-methoxyindol	5-MeO-DIPT	96.1	N.C.L.
N-isopropyl-1-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-N-methylethan-2-amine	5-MeO-MIPT	99.5	P.A.L.
5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine	5-MeO-DMT	91.7	P.A.L.
N,N-diallyl-5-methoxytryptamine	5-MeO-DALT	87.8	P.A.L.
Piperazines			
1-(3-chlorophenyl)piperazine	3CPP	98.0	N.C.L.
1-(4-methoxyphenyl)piperazine	4MPP	90.0	P.A.L.
1-benzylpiperazine	BZP	98.0	N.C.L.

a) As of 2009/08/20. b) Narcotic Control Law of Japan. c) Pharmaceutical Affairs Law of Japan. d) Stimulant Control Law of Japan.

マイクロダイアリシス（脳内局所微量透析）法によって回収された生体試料を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下HPLC-ECDと略す）で測定分析することで、より詳細な結果が得られる。このマイクロダイアリシス法とHPLC-ECDによる分析を組み合わせた測定方法は、実験動物を生きたまま、無拘束に近い状態での自由行動下でドラッグ投与前から投与後に至る時間経過に伴ったモノアミン量の変化を追跡可能である。従って、ドラッグ等がどの神経伝達物質作動性神経系に作用するのか、さらにその作用の大きさと作用時間を端的に調べることができるため、ドラッグの中枢神経作用をこの方法で検討した¹⁵⁾。

本総説では、これら4種類のスクリーニング法の紹介と、これらの方法を用いて調べたドラッグの作用をまとめて報告する。

3. 各スクリーニング試験法

1) 測定対照ドラッグ

中枢神経系への影響を調べたドラッグ名とその省略名およびHPLCにより確認した純度および現在の指定根拠（麻薬、覚せい剤、薬事法指定薬物）はTable 1に、それぞれの化学構造式はFig. 2に示す。Table 1に記載したMDMA, MBDB, TMA, AMT, 5-MeO-DIPT, BZPは都研安研医薬品部医薬品研究科より法律に従い譲渡された。その他のドラッグは、法律で規制される以前に都内のアダルトショップ等で購入した。ドラッグは、その構造からフェネチルアミン系、トリプタミン系、ペペラジン系に分類した。陽性対照としては、cocaine（武田薬品）とMAP（大日本住友製薬）を用いた。In vivoスクリーニング系においてドラッグは水に溶解し、in vitro系では測定緩衝液もしくは0.1%DMSO含有測定緩衝液に溶解し、最大濃度 10^{-4} Mまで検討した。

2) 動物の行動および神経症状観察試験¹⁶⁾

動物の行動および神経症状の生体影響の評価は、Irwinらの多元観察法¹⁷⁾を改良し、非常に複雑で観察の評価に熟練を要するこの方法を基に、簡明かつ迅速に観察評価が可能となるような点数法を考案して行った¹⁶⁾。作用の発現様式あるいは作用強度は、観察項目毎に客観性を持たせた得点表により、1匹ずつ数値化した（Fig.3）。各観察項目における得点は、ドラッグを投与していない対照動物にみられる行動あるいは神経症状を基準の0として、興奮・亢進作用をプラス側に、抑制・鎮静作用をマイナス側に設定し、作用の強度に応じて3段階に分けた。それぞれの観察項目については、被験動物5匹の平均値を以て評価値とした。実際の試験においては、動物を一匹ずつ新しい観察用プラスチックケージに移し、それぞれの行動を観察し、目視とビデオ映像記録を併用して評価を行った。通常のスクリーニング試験においては、1群5匹の雄マウスを用い、ヒト使用量の100倍量を高用量として公比10で中用量・低用量を設定したドラッグを、3日間連続強制経口投与し、投与終了後30分・

1時間・2時間の行動、中枢神経症状および自律神経症状について観察した。観察項目は、行動について攻撃性・反復動作・洗顔・外界反応等9項目（Table 2）、中枢神経症状について自発運動・異常姿勢・異常歩行・挙尾・耳介反射・痙攣等13項目（Table 3）、自律神経症状について眼球突出・瞳孔・便・よだれ・心拍数・立毛等13項目（Table 4）とした。評価値の絶対値が1以上の場合は強い作用がある（赤枠表示）、0.6から0.8の場合は作用が疑われる（黄色塗りつぶし表示）、0.4以下の場合は作用が無い、と判定した。

全ての動物実験は、都健安研倫理審査委員会の事前承認を得た上で、同動物実験管理規定に従って行なった。

3) 小動物行動解析装置を用いた生体影響試験¹⁸⁻²⁰⁾

(1) 測定時間の検討

ドラッグの投与により効果が現れ、やがてその効果が消失していくまでの過程を時間を追って観察するためには、対象ドラッグによって時間の幅があるが、おおむねドラッグ投与から3時間でその傾向が把握できると判断し、測定時間を違法ドラッグの投与直後からの3時間とした。

(2) 自発行動の測定

自発行動の行動活性は、雄マウスを用いて小動物行動解析装置 ANIMATE AT-420（東洋産業社製）によって測定した^{18, 19)}。なお、平成20年度からはSCANET CV-40（メルクエスト社製）を用い測定している²⁰⁾。測定は、180分間（3時間）に、10分間隔で18回行った。また、測定時間帯により自発行動に差が見られることから、測定は、1日1回9:30～13:00までの時間帯に行った。ANIMATE AT-420は、測定部を2台有することから、対照群と投与群を同時測定し、測定個体数を各群3匹とした。SCANET CV-40は、測定部を4台有するために、各群5匹で実施した。

4) In vitroスクリーニング法¹²⁻¹⁴⁾

(1) 再取り込み阻害作用¹²⁾

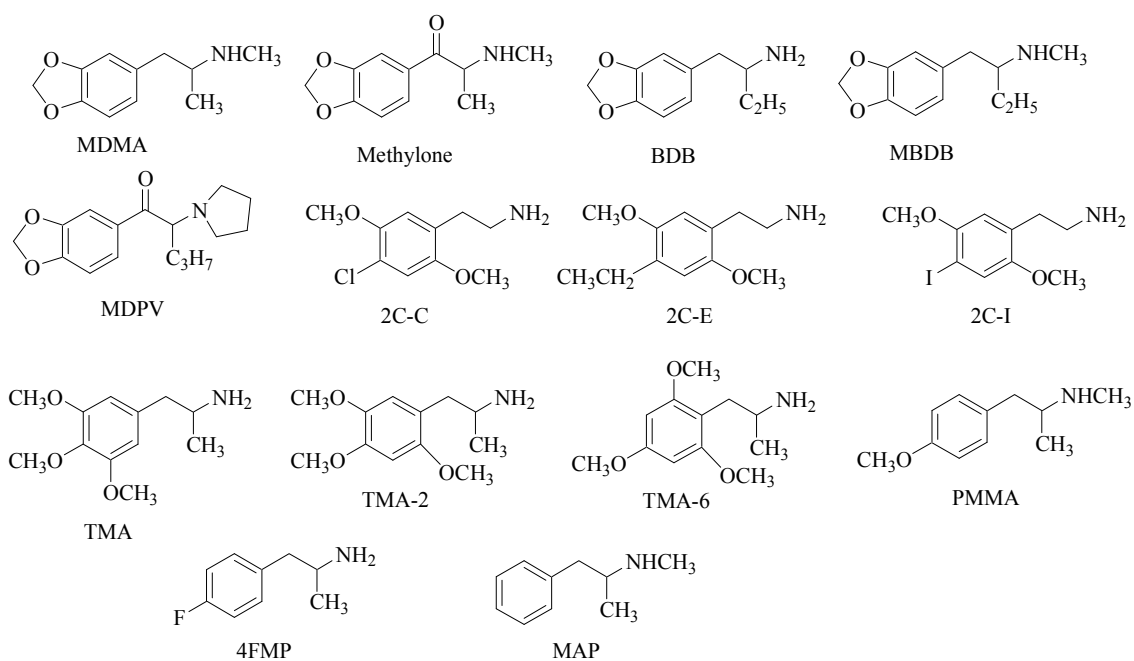
ラット脳シナプトソームの精製は、エーテル麻酔下切断したラット頭から脳を速やかに摘出後、線条体と皮質を単離し、Fleckenstein等の方法²¹⁾に準じて我々が開発した方法¹²⁾に従って行った。線条体シナプトソームはDAの測定に、皮質シナプトソームは5-HTとNEの測定に使用した。

再取り込み阻害作用測定は、Rothman等の方法^{22, 23)}に準じて我々が開発した方法¹²⁾に従って行なった。 [³H]5-HT再取り込みは、DAやNEの神経末端への取り込みを妨げるために100 nM nomifensineと200 nM GBR12935存在下で測定した。DAと5-HTの非特異的な再取り込み量はそれぞれ10 μ M GBR12909と10 μ M citalopram存在下で得た値とし、NEのそれは反応温度0°Cで得た値とした。特異的な結合量は、全再取り込み量から非特異的な再取り込み量を差し引くことによって求めた。これらの結果から再取り込み阻害曲線を作成し、ドラッグの50%阻害濃度（以下IC₅₀と略す）を求めた。

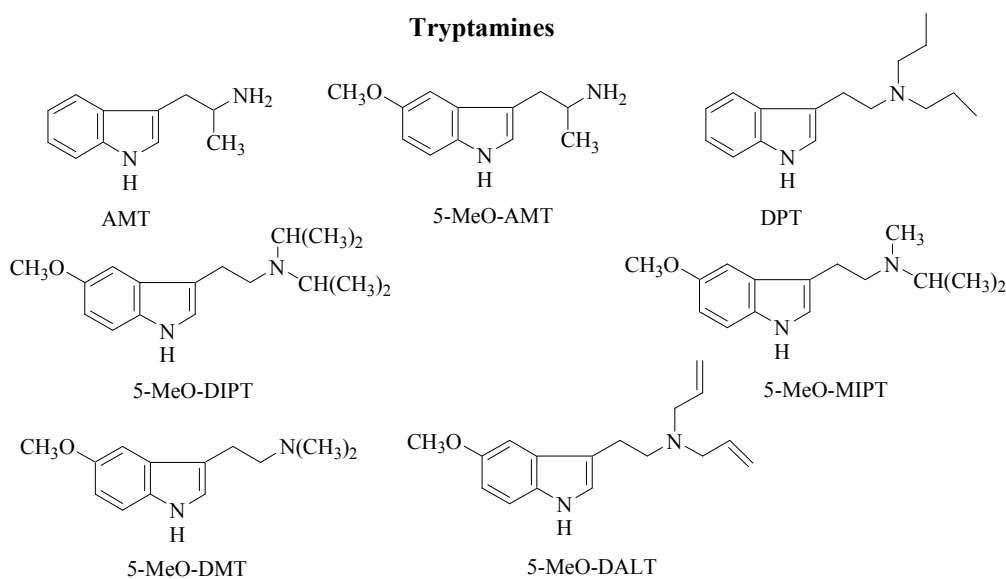
(2) 遊離促進作用¹²⁾

ラット脳シナプトソーム精製は、1 μ M reserpineを総ての

Phenethylamines



Tryptamines



Piperazines

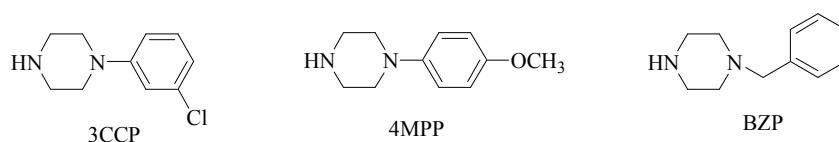


Fig. 2. Structures of assessed drugs.

シナプトソーム精製溶液に加え、前項と同様に行い、精製後直ちに遊離促進作用の測定を実施した¹²⁾。非特異的な遊離量は、DAとNEについて10 μM tyramine、また5-HTについて100 μM のtyramine存在下での反応値とした。特異的な遊離量は、全遊離量から非特異的な遊離量を差し引くことによ

って求めた。これらの結果から遊離促進曲線を作成し、ドラッグの50%活性化濃度（以下EC₅₀と略す）を求めた。

(3) G-タンパク結合作用¹³⁾

ラット脳シナプトソームは、エーテル麻酔下切断したラット頭から脳を速やかに摘出後、前項・前々項と同様に行

Table 2. Average value of observation compared with AMT and 5-MeO-AMT for behavior

Groups	Timing	Observation items									
		Stereotypy		Verticalness		Sound response		Touch response		Pain response	
		AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT
Control	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.12 mg/kg	0.5 h	0	0	0	0	0	+ 0.2	0	+ 0.6	0	+ 0.4
	body	1	0	+ 0.2	0	+ 0.4	0	+ 0.4	0	0	+ 0.6
	weight	2	0	+ 0.2	0	+ 0.2	0	+ 0.4	0	+ 1.2	+ 1.4
1.2 mg/kg	0.5 h	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.4	+ 0.6	+ 0.6	+ 0.6	+ 0.6
	body	1	+ 0.8	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.6	+ 1.0	+ 1.0	+ 0.8	+ 1.4
	weight	2	+ 0.2	+ 0.6	+ 0.4	+ 0.8	+ 0.6	+ 1.0	+ 1.2	+ 1.0	+ 1.2
12 mg/kg	0.5 h	+ 0.8	+ 1.4	+ 0.6	- 1.4	+ 0.2	+ 0.4	0	+ 0.6	+ 0.2	+ 0.6
	body	1	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.4	+ 0.6	+ 0.6	+ 0.8	+ 1.2	+ 1.0
	weight	2	+ 0.6	+ 0.6	+ 0.6	+ 0.6	+ 0.6	+ 1.2	+ 1.2	+ 1.2	+ 1.4

Table 3. Average value of observation compared with AMT and 5-MeO-AMT for central nerves

Groups	Timing	Observation items									
		Spontaneous activity		Pinna reflex		Corneal reflex		Tendon reflex		Tremor	
		AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT
Control	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.12 mg/kg	0.5 h	0	0	0	+ 0.4	0	+ 0.4	0	+ 0.6	0	0
	body	1	0	+ 0.2	0	+ 0.6	0	+ 0.6	0	+ 0.6	0
	weight	2	0	+ 0.2	0	+ 0.6	0	+ 0.4	+ 0.2	+ 1.0	0
1.2 mg/kg	0.5 h	+ 0.4	+ 0.8	0	+ 0.4	0	+ 0.4	+ 0.4	+ 0.8	0	0
	body	1	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.4	+ 1.0	+ 0.4	+ 0.8	+ 1.0	+ 1.4	0
	weight	2	+ 0.2	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.8	+ 1.4	+ 1.4	0
12 mg/kg	0.5 h	0	- 1.4	0	+ 0.6	+ 0.2	+ 0.4	+ 0.2	+ 0.4	0	+ 0.8
	body	1	+ 1.0	- 0.2	+ 0.6	+ 0.8	+ 0.4	+ 0.4	+ 0.6	+ 1.0	0
	weight	2	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.4	+ 1.0	+ 0.4	+ 0.6	+ 1.2	+ 1.4	0

Table 4. Average value of observation compared with AMT and 5-MeO-AMT for autonomic nerve

Groups	Timing	Observation items									
		Exophthalmos		Palpebral opening		Heart rate		Piloerection		Skin color	
		AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT	AMT	5-MeO-AMT
Control	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.12 mg/kg	0.5 h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+ 0.2
	body	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	weight	2	0	0	0	+ 0.4	0	0	0	0	0
1.2 mg/kg	0.5 h	0	+ 0.4	0	+ 2.8	0	0	0	0	+ 0.2	+ 0.6
	body	1	0	+ 0.6	+ 1.8	+ 2.4	0	0	+ 0.2	+ 0.2	+ 0.8
	weight	2	0	+ 0.2	+ 0.8	+ 2.2	0	0	+ 0.4	0	+ 0.6
12 mg/kg	0.5 h	0	+ 0.6	+ 0.6	+ 2.6	0	+ 1.4	0	+ 0.4	+ 0.6	+ 1.4
	body	1	+ 0.4	+ 0.4	+ 3.0	+ 3.0	+ 0.6	0	+ 0.2	+ 0.4	+ 0.8
	weight	2	+ 0.2	+ 0.6	+ 2.4	+ 2.8	0	0	+ 0.6	+ 0.4	+ 0.8

い, サポニン処理後精製した. 得られたシナプトソームは, 小分けして実験時まで -80°C で保存した. G-タンパク結合作用は, $10\ \mu\text{M}$ 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (以下DPCPXと略す) 含有の緩衝液中で実施した¹³⁾. 活性化値は, モノ

アミン類もしくはドラッグで活性化したGTP γ S結合値から, コントロール値 (ドラッグを溶解した0.1%溶媒) を差し引いて求めた. 活性化曲線を作成し, ドラッグの50%活性化濃度 (EC_{50}) を求めた. 測定可能な最高濃度でも最大活性

観察項目	← 抑制作用			正 常	興奮作用 →		
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
自発運動	全く動かない 1・2・3・4・5	運動量少ない 1・2・3・4・5	動きが悪い 1・2・3・4・5	適度に動く 1・2・3・4・5	動きが良い 1・2・3・4・5	運動量多い 1・2・3・4・5	走り回る 1・2・3・4・5
異常歩行	歩行困難 1・2・3・4・5	よろめく 1・2・3・4・5	少し引きずる 1・2・3・4・5	正常歩行 1・2・3・4・5	少し早歩き 1・2・3・4・5	小頻で走る 1・2・3・4・5	飛び跳ねる 1・2・3・4・5
異常姿勢	保持困難 1・2・3・4・5	不安定姿勢 1・2・3・4・5	少し傾く 1・2・3・4・5	正常姿勢 1・2・3・4・5	正常姿勢 1・2・3・4・5	正常姿勢 1・2・3・4・5	正常姿勢 1・2・3・4・5
筋緊張度	麻痺状態 1・2・3・4・5	弱い 1・2・3・4・5	少し弱い 1・2・3・4・5	適度な緊張 1・2・3・4・5	少し強い 1・2・3・4・5	強い 1・2・3・4・5	痙攣状態 1・2・3・4・5
挙尾反応				無し	少しある	多い	非常に多い

Fig. 3 Score of observations for behavior and neural symptoms.

化値が得られなかったドラッグについては、basalな結合に対する活性化した割合（以下% E_{max} と略す）で示した。ドラッグによるG-タンパク活性化作用が認められた時は、モノアミン受容体選択的アンタゴニスト7種類¹³⁾の存在下において再度測定を行い、活性化を抑えたアンタゴニストから、どのモノアミンの受容体に結合したのかを判定した。

5) マイクロダイアリス法²⁴⁾

(1) 実験動物

市場から入手できる違法ドラッグの量が少ないことが多いため、試験では、被験物質使用量をできるだけ少なくするために、CrJ:CD1(ICR)系雄性マウス（日本チャールズリバー）を生後8週齢、体重34～39 gで用いた。動物は、搬入後、室温25°C・湿度50%・照明時間午前6時～午後6時の飼育環境の飼育室で固形試料CE-2（日本クレア）を与えて7日間馴化した後、試験に供した。なお、生体試料回収に7時間を要することから、試験は、実験上管理が可能な範囲である4匹のマウスを用いて行った。

(2) 神経伝達物質を含む生体試料の回収部位

線条体（Striatum）は、ほとんど全ての神経伝達物質作動性神経の軸索終末が存在し、中枢神経内に占める領域が広い。ため、マイクロダイアリスプローブ（以下プローブと略す）を刺入・留置・固定する術が比較的容易であり、生体試料の回収に用いることが多い。従って、我々も線条体からの生体試料を回収することにした。

(3) 脳の生体試料回収方法

脳から生体試料を回収するマイクロダイアリスの方法には2通りある。一つは、径の太いステンレス製パイプをガイド・パイプとして脳に刺入・固定・留置し、その外科手術から1週間程度の回復を待って、プローブをガイド・パイプ内に挿入する方法である。この方法は、術後の回復を待てる点で優れているが、小型のマウスの場合、脳の大きさに比して太すぎるパイプが脳に刺入され、脳組織の物理的損傷程度が大きくなるので、主としてラットに使われ、マウスの実験に採用されることが少ない。もう一つは、直埋式プローブ（エイコム社D-I型）を脳に直接刺入して留置する方法である。この方法は、術後3日以降で透析膜凝固によって試料回収が困難になる。従って、術後2日以内にマイ

クロダイアリスをおこなう必要がある。また、刺入術後から比較的短い経過時間後に試料採取するため、採取された試料が安定しにくいことが懸念される。しかしながら、マウスはプローブ刺入・固定・留置術の麻酔から約3時間後に覚せいし、外科手術の翌日には水と餌の摂取を認め、行動に異常は認められない。また、ドラッグ投与前の神経伝達物質量を測定した結果、それらの値は安定しており、投与後の経時の変化が検出できたことから、この直埋型プローブを使った方法を採用した。なお、マウスの線条体は背側・腹側の長さが3 mm程度あること、また、透析膜の長い方が神経伝達物質の回収率がよいことから、2 mmの透析膜を持つエイコム社のD-I-2型を使用した²⁴⁾。

試験では、我々の開発した方法²⁴⁾に従い、プローブ埋め込み外科手術の翌日に低用量のドラッグ、翌々日に高用量のドラッグを投与し、生体試料を回収した。手術からの回復を確認したマウスを30 cm x 30 cm x 40 cmの亚克力製箱に入れ、自由行動下でプローブをマイクロポンプ（エイコム社ESP-64）に接続して、透析液を4 μ L/minの流速で90分間流し、続いて2 μ L/minの流速で30分間流した後に試料採取を開始した。試料採取開始から30分後に蒸留水を経口投与した。蒸留水投与から1時間後にドラッグを経口投与し、投与から3時間後まで試料採取を続けた。回収には2 μ L/minの流速で透析し、フラクションコレクター（エイコム社製EFC-82）を用いて、それぞれ10分毎に20 μ L/試験管の生体試料を回収した。回収した試料は、EDTA・NaH₂PO₄含有0.03 Mリン酸緩衝液（pH 3.0）中で分析時まで-80°Cで凍結保存した。

(4) 回収した生体試料の分析方法

マイクロダイアリスにより回収した生体試料中の神経伝達物質は、極めて微量なので、高感度分析装置で分析し、サンプリングから機器等のメンテナンスをも含めた細心の注意が必要となる。我々は、DA、5-HT、NEを同時に測定するために、HPLC-ECD装置（エイコム社HTEC-500）を使用した。分析条件は分離カラム、エイコム社製EIKOMPAK CAX；移動相、メタノール：0.05 M硫酸ナトリウム・50 mg/L EDTA-2Na含有0.1 M酢酸アンモニウム緩衝液（3:7, pH 6.0）；移動相流速、250 μ L/min；分析温度、35°C；作用電極、グラフアイト電極；参照電極、銀・塩化銀；設定電圧、+450mV vs. Ag/AgClであった。

得られたクロマトグラムからは、各モノアミン量の経時変化を求めた。各マウスについて、それぞれ、水を投与する前の30分間の各モノアミン量の平均値を100%として、それぞれの変化率を求め、各実験群のモノアミンの経時変化をグラフにした。ドラッグ投与により生じた変化の有意性は、ドラッグ投与前30分間の変化率に対する有意差検定（ t -test, $p < 0.01$ ）によって判定した。

4. 各スクリーニング試験法による結果の解説

1) 動物の行動および神経症状観察試験

開発した試験法を用いてスクリーニングした未規制ドラ



Fig. 4. Behavior of mice treated with 20 mg/kg MDPV.
a: control mouse, b: after 30 min. treatment, c: after 1 hr. treatment

ッグの中で、薬事法指定薬物となった2ドラッグについて、それらの構造類似体である麻薬と比較した結果を述べる。

(1) MDMAとMDPVとの比較

MDPVは、ヒトでの通常使用量が約10 mgであることから、ヒトの体重を50 kgとすると0.2 mg/kg体重となるので、これを低用量とし、その10倍量 (2.0 mg/kg体重)、100倍量 (20 mg/kg体重) の3用量で試験に供した。MDPV未投与の対照動物は、一定の探索行動を終えた後、静かにうずくまり自発運動がほとんど認められない状態を示した (Fig. 4a)。MDPV投与後30分 (Fig. 4b) と1時間 (Fig. 4c) では、非常に活発に自発運動が亢進され、それが長時間継続した。MDPVを投与した時の行動、中枢神経症状および自律神経症状の各観察項目を調べたところ、高用量 (20 mg/kg体重) 投与群で評価値が1以上の強い作用が観察された。行動の変化は、0.2または2 mg/kg体重投与群で顕著な変化が認められないが、20 mg/kg体重投与群で反復動作・外界反応・触反応・痛反応・立ち上がり動作の著しい動物がみられた。中枢神経症状では、20 mg/kg体重投与群で自発運動の亢進・過敏な早歩き・歩行・挙尾・耳介反射や角膜反射・払いのけの腱反射の増加が観察された。自律神経症状では、0.2 mg/kg体重投与群において変化が無いが、2 mg/kg体重投与群で眼瞼が大きく開裂し、立毛を呈する動物がみられ、20 mg/kg体重投与群で軽度眼球突出や瞳孔散大がみられると共に、2 mg/kg体重投与群より眼瞼の開裂が顕著となった。また、尾や耳介等の皮膚の赤みが増した動物が20 mg/kg体重投与群で認められた。これらの行動および神経症状については、投与後2時間まで強く持続する動物が多かった (以上、データを示さず)。

一方、MDPVの構造類似体であるMDMAは、ヒトでの通常使用量が約100 mgとMDPVの10倍であることから、低用量を2 mg/kg体重とし、その10倍量 (20 mg/kg体重)、100倍量 (200 mg/kg体重) の3用量で試験に供した。行動観察では、投与した30分後の2 mg/kg体重投与群で反復動作を示す動物がみられ、この変化が用量が増すに従い強く現れた。また、触反応・痛反応・外界反応等についても、用量に相関して増強した。中枢神経症状では、耳介反射や払いのけ反射がヒトの使用量に当たる2 mg/kg体重投与群からみられ、投与量の増加と共に自発運動の亢進・異常歩行・角膜

反射の増強が観察された。自律神経症状では、瞳孔の散大がヒトの使用量に当たる2 mg/kg体重投与群からみられ、眼瞼の開裂や立毛も投与量の増加に伴い増強したほか、他の項目においてもMDPVと同様に投与量に依存する作用の増強を認めた (以上、データを示さず)。

以上の結果から、MDPVの神経系におよぼす影響は、MDMAと類似した興奮的・活動的・知覚過敏的な作用であるものと推察された。

(2) AMTと5-MeO-AMTとの比較

5-MeO-AMTは、ヒトでの通常使用量が約6 mgであることから、低用量を0.12 mg/kg体重とし、その10倍量 (1.2 mg/kg体重)、100倍量 (12 mg/kg体重) の3用量で試験に供した。主な作用がみられた項目を選択して比較を行うと、行動に関する観察では、反復動作・立ち上がり動作・外界反応・触反応・痛反応で0.12 mg/kg体重投与群から増強がみられた (Table 2)。しかし、5-MeO-AMTの構造類似体であるAMT投与群では、ほとんど変化が認めなかった。またこれらの観察項目では、1.2および12 mg/kg体重投与群で作用が増強した。観察された反復動作の特徴は、首を伸ばした頭部の首振り運動の回数の増加であり、投与後30分の早期からみられ、一般的にセロトニンが関与している症状といわれている変化に相当する²⁵⁾。中枢神経症状では、自発運動の亢進・耳介反射・角膜反射・払いのけ動作において、行動の場合と同様に増強作用が認められ、投与後2時間で、自発運動が著しく亢進し、立ち上がり動作も回数の増加を示した

(Table 3)。自律神経症状では、眼球突出・眼瞼開裂・立毛・尾部の赤みを呈した皮膚症状が5-MeO-AMTの1.2 mg/kg体重投与群でみられたが、AMT群では明らかではなかった (Table 4)。12 mg/kg体重投与群では、AMT投与群および5-MeO-AMT投与群共に増強作用がみられたが、5-MeO-AMT投与群の方が若干強い作用を示した。

これらの結果から、5-MeO-AMTとAMTは、興奮作用および幻覚が疑われる作用を持つものと示唆され、5-MeO-AMTの方がAMTよりやや強い作用を示した。

2) 小動物行動解析装置を用いた生体影響試験

これまでに陽性対照物質である覚せい剤MAPを含む25物質について自発行動の測定を行った。MAPは全測定時間に

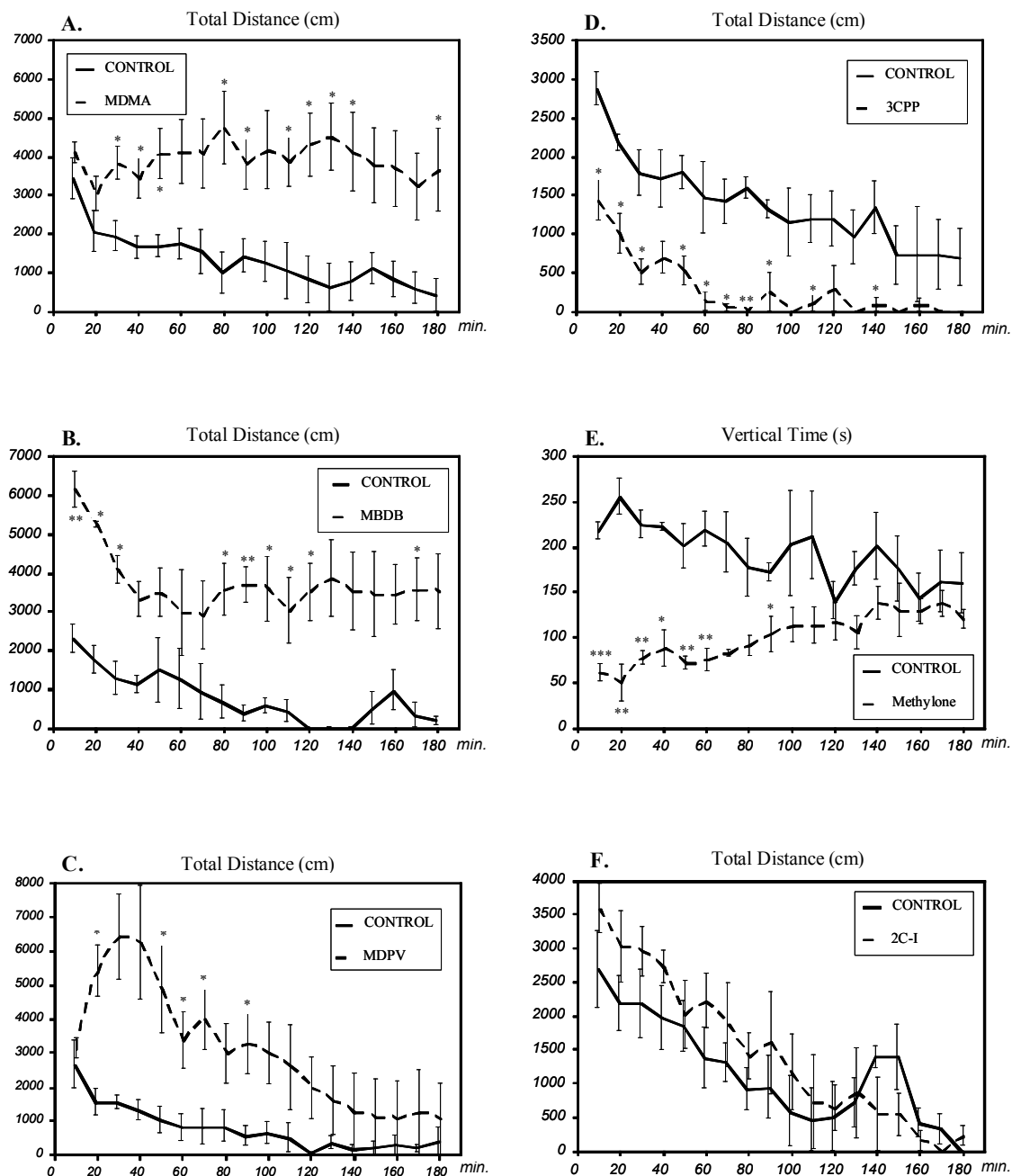


Fig. 5. Movement activity of spontaneous behavior of male mice administered assessed drugs. A, MDMA (20 mg/kg); B, MBDB (400 mg/kg); C, MDPV (20 mg/kg); D, 3CPP (60 mg/kg); E, Methylone (90 mg/kg); F, 2C-I (40 mg/kg). Each value represents the mean $\pm$ SE. Significant different from controls: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

わたって著しい興奮性作用を示したが、そのほかに、麻薬であるBZP・MDMA (Fig. 5A)・MBDB (Fig. 5B)・MDPV (Fig. 5C)のように、MAPに較べれば弱いものの比較的高い興奮性を示すドラッグがいくつか検出された。また、全測定時間に渡って著しい行動抑制を示した麻薬の4-hydroxybutyric acid (以下GHBと略す)の他、3CPP (Fig. 5D)が抑制性の作用を示した。さらに、methylone (Fig. 5E)のように、行動量は増加するものの立ち上がりは抑制され、後肢を引きずるように移動していると予測される物質もあった。一方、2C-I (Fig. 5F)のように後に麻薬に指定された

化合物も含め、行動量には明らかな変化が認められない物質もあった。

3) *In vitro*スクリーニング

(1) 再取り込み阻害作用

Cocaine・MAP・代表的なドラッグの再取り込み阻害曲線をFig. 6のa~fに、測定したドラッグすべての IC_{50} 値をTable 5に示す。CocaineおよびMAPは、非常に強く再取り込みを阻害した。

フェネチルアミン系であるMDMA・methylone・BDB・

Table 5. Re-uptake inhibition and release acceleration of monoamines, and GTPγS binding by various psychoactive drugs¹³⁻¹⁵⁾

Drugs	Re-uptake (IC ₅₀ , M) ^{a)}			Release (EC ₅₀ , M) ^{b)}			G-Protein Binding	
	DA	5-HT	NE	DA	5-HT	NE	EC ₅₀ (M)	% of 5-HT maxima ^{c)}
Phenethylamines								
MDMA	1.4 x 10 ⁻⁶	7.2 x 10 ⁻⁷	6.6 x 10 ⁻⁷	2.0 x 10 ⁻⁷	5.8 x 10 ⁻⁸	8.6 x 10 ⁻⁸	n.e. ^{d)}	- ^{e)}
Methylone	2.9 x 10 ⁻⁶	2.3 x 10 ⁻⁶	7.4 x 10 ⁻⁷	3.8 x 10 ⁻⁷	2.2 x 10 ⁻⁷	9.3 x 10 ⁻⁸	n.e.	-
BDB	7.9 x 10 ⁻⁶	1.6 x 10 ⁻⁶	2.8 x 10 ⁻⁶	2.3 x 10 ⁻⁶	1.8 x 10 ⁻⁷	5.4 x 10 ⁻⁷	n.e.	-
MBDB	6.3 x 10 ⁻⁶	1.8 x 10 ⁻⁶	2.7 x 10 ⁻⁶	n.e.	5.4 x 10 ⁻⁷	3.3 x 10 ⁻⁶	n.e.	-
MDPV	4.3 x 10 ⁻⁸	1.6 x 10 ⁻⁵	1.7 x 10 ⁻⁸	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-
2C-I	n.e.	7.9 x 10 ⁻⁵	3.7 x 10 ⁻⁵	n.e.	n.e.	n.e.	n.d. ^{f)}	46
2C-E	n.e.	7.2 x 10 ⁻⁵	8.9 x 10 ⁻⁵	n.e.	n.e.	n.e.	n.d.	29
2C-C	n.e.	3.1 x 10 ⁻⁵	6.3 x 10 ⁻⁵	n.e.	n.e.	1.0 x 10 ⁻⁴	n.d.	77
TMA	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	1.6 x 10 ⁻⁵	n.e.	n.e.	-
TMA-2	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-
TMA-6	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-
PMMA	1.4 x 10 ⁻⁵	4.7 x 10 ⁻⁷	2.2 x 10 ⁻⁶	1.6 x 10 ⁻⁶	4.8 x 10 ⁻⁸	9.4 x 10 ⁻⁷	n.e.	-
4FMP	7.7 x 10 ⁻⁷	6.8 x 10 ⁻⁶	4.2 x 10 ⁻⁷	2.0 x 10 ⁻⁷	7.3 x 10 ⁻⁷	3.7 x 10 ⁻⁸	n.e.	-
Tryptamines								
AMT	7.3 x 10 ⁻⁷	3.8 x 10 ⁻⁷	4.0 x 10 ⁻⁷	1.8 x 10 ⁻⁷	6.8 x 10 ⁻⁸	7.9 x 10 ⁻⁸	n.d.	39
5-MeO-AMT	1.8 x 10 ⁻⁵	2.9 x 10 ⁻⁶	3.7 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻⁶	4.6 x 10 ⁻⁷	8.9 x 10 ⁻⁶	n.d.	67
DPT	2.3 x 10 ⁻⁵	2.9 x 10 ⁻⁶	9.1 x 10 ⁻⁶	n.e.	n.e.	n.e.	n.d.	46
5-MeO-DIPT	6.5 x 10 ⁻⁵	2.2 x 10 ⁻⁶	8.2 x 10 ⁻⁶	n.e.	n.e.	n.e.	2.5 x 10 ⁻⁶	49
5-MeO-MIPT	n.e.	6.4 x 10 ⁻⁶	2.6 x 10 ⁻⁵	n.e.	n.e.	n.e.	n.d.	68
5-MeO-DMT	n.e.	4.1 x 10 ⁻⁶	3.3 x 10 ⁻⁵	n.e.	n.e.	n.e.	3.8 x 10 ⁻⁷	115
5-MeO-DALT	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	6.6 x 10 ⁻⁷	76
Pyperazines								
BZP	1.9 x 10 ⁻⁶	2.0 x 10 ⁻⁵	6.2 x 10 ⁻⁷	6.0 x 10 ⁻⁷	n.e.	6.8 x 10 ⁻⁸	n.e.	-
3CPP	1.2 x 10 ⁻⁵	3.3 x 10 ⁻⁷	2.5 x 10 ⁻⁶	6.3 x 10 ⁻⁵	2.8 x 10 ⁻⁸	1.4 x 10 ⁻⁶	9.3 x 10 ⁻⁷	37
4MPP	4.8 x 10 ⁻⁵	4.6 x 10 ⁻⁶	6.2 x 10 ⁻⁶	1.1 x 10 ⁻⁵	3.2 x 10 ⁻⁶	1.5 x 10 ⁻⁶	n.d.	17
Positive controls								
Cocaine	8.5 x 10 ⁻⁷	2.1 x 10 ⁻⁶	3.4 x 10 ⁻⁷	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	-
MAP	3.7 x 10 ⁻⁷	4.0 x 10 ⁻⁶	2.0 x 10 ⁻⁷	2.8 x 10 ⁻⁸	7.9 x 10 ⁻⁷	1.1 x 10 ⁻⁸	n.e.	-
DA	-	-	-	-	-	-	n.d.	68
5-HT	-	-	-	-	-	-	4.9 x 10 ⁻⁸	100
NE	-	-	-	-	-	-	3.0 x 10 ⁻⁶	110

a) Drug concentrations giving half-maximal inhibition. b) Drug concentrations giving half-maximal acceleration.

c) The maximal % increase in [³⁵S]GTPγS binding over basal binding is expressed as a percentage of the maximal 5-HT response, which is set to 100 %. d) No effect at 10⁻⁴ M of each drug. e) Not calculated.f) EC₅₀ value not determined because binding was not maximum at 10⁻⁴ M.

DA: Dopamine, 5-HT: Serotonin, NE: Norepinephrine.

MBDB・MDPV・4FMPは、cocaineや同系に属するMAPに匹敵するほど作用が強かった。しかし、PMMAはDAに対する作用のみがMAPのそれより減少し、2C-I・2C-E・2C-CはまずDAへの作用が消失し5-HT・NEに対する作用も弱くなった。さらにTMA・TMA-2・TMA-6には、再取り込み阻害作用を認めなかった。

トリプタミン系では、AMTの作用が最も強く、特に5-HT

に対する作用がcocaineとMAPより強く、DAとNEに対して同程度であった。また、トリプタミン骨格の側鎖が5-MeO-AMT・DPT・5-MeO-DIPTのように嵩高くなるに従って、DAへの作用が徐々に消失し、5-HT・NEへの作用も弱くなり、5MeO-DALTでは再取り込み阻害作用が消失した。ピペラジン系の3種類のドラッグの作用は強く、cocaineやMAPと較べると、DAへの作用が弱い、3CPPのように

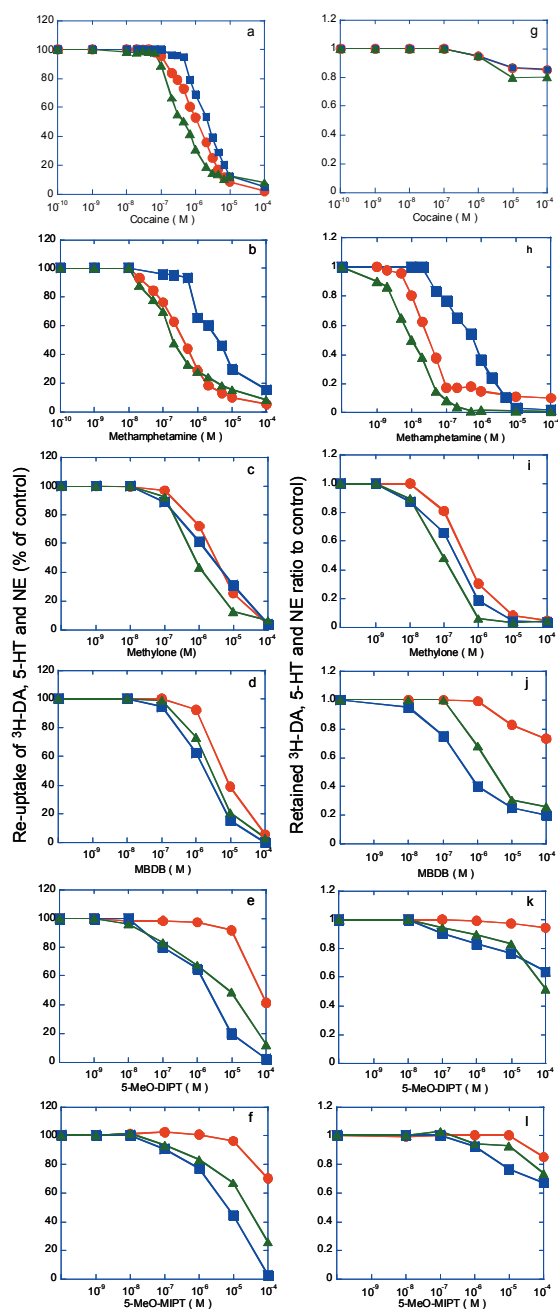


Fig. 6. Re-uptake inhibition and release acceleration of monoamines by cocaine, MAP and assessed drugs in rat brain synaptosome.¹²⁾

Synaptosome fraction from striatum was used for the assay of DA, and that from cortex was used for the assays of 5HT and NE. ●, DA; ■, 5-HT; ▲, NE. a-f: re-uptake. g-l: release. a and g, cocaine; b and h, MAP; c and i, Methylone; d and j, MBDB; e and k, 5-MeO-DIPT; f and l, 5-MeO-MIPT.

5-HTに対して約10倍強くなるものがあった。

(2) 遊離促進作用

Cocaine・MAP・代表的なドラッグの遊離促進曲線をFig. 6のg~lに、測定したドラッグすべてのEC₅₀値をTable 5に示す。MAPの作用は非常に強く、cocaineに遊離促進作用を認めなかったことはこの物質が特異的な再取り込み阻害剤であることを裏付ける結果であった。

フェネチルアミン系であるMDMA・methylone・BDB・PMMA・4FMPはほぼMAPに匹敵するほどの強い作用があ

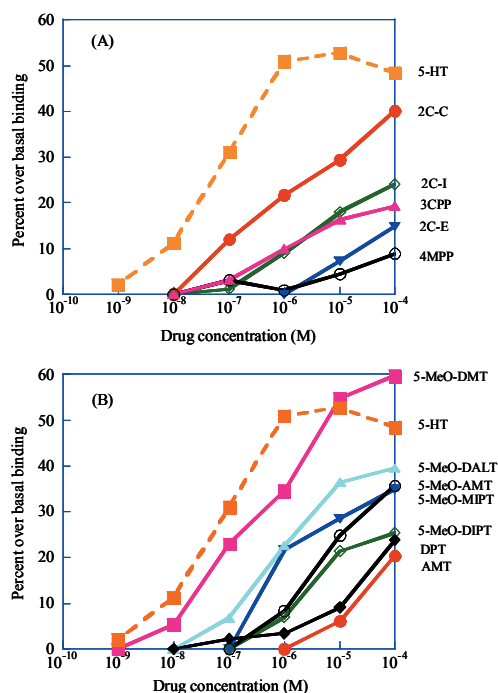


Fig. 7. Representative concentration-response curves for [³⁵S]GTPγS binding by assessed drugs in cortical membranes.¹³⁾

Specific [³⁵S]GTPγS binding was measured in the presence of various concentrations of psychoactive drugs. (A) and (B) indicate the results from phenethylamine, piperazine, and tryptamine derivatives, respectively. The results are expressed as the percentage of the basal binding (0.1 % DMSO). (A): ■ (dotted line), 5-HT; ●, 2C-C; ◆, 2C-I; ▼, 2C-E; ▲, 3CPP; ○, 4MPP. (B): ■, 5-HT (dotted line); ■, 5-MeO-DMT; ▲, 5-MeO-DALT; ▼, 5-MeO-AMT; ○, 5-MeO-MIPT; ◆, 5-MeO-DIPT; ◆, DPT; ●, AMT.

るが、MBDBに関しては5-HT・NEに対しての作用が強いがDAへの作用が消失し、MDPVは全体的に作用が弱かった。2C-CはNEに、またTMAは5-HTに弱い作用を認めたが、2C-I・2C-E・TMA-2・TMA-6には遊離促進作用がなかった。

トリプタミン系では、AMTの作用が最も強かったが、MAPと比較すると、DAに対する作用が弱い、5-HTに対してより強く、NEに対して同程度だった。次に作用が強かったのは5-MeO-AMTであり、DPT・5-MeO-DIPT・5-MeO-MIPT・5-MeO-DMT・5-MeO-DALTには遊離促進作用を認めなかった。

ピペラジン系のドラッグ3種類は、BZPに5-HTに対する作用が無い以外、それぞれのモノアミンに対する作用を認めたが、MAPと比較すると弱かった。

(3) G-タンパク結合作用

ドラッグのG-タンパク結合曲線は、それぞれFig. 7AおよびBに示す。測定した24ドラッグの内12ドラッグにG-タンパク結合作用を認めたが、CocaineとMAPには、作用を認めなかった (Table 5)。

フェネチルアミン系では、14ドラッグのうち2C-I・2C-E・

2C-Cにのみ作用を認めたが、2C-Cの作用が最も強く、次に強かったのが2C-Iで、2C-Eが3物質中で最も弱かった (Table 5, Fig. 7A) . さらに、2C-Cと2C-Iが結合した受容体は、選択的アンタゴニストを用いた結果から、いずれも5-HT₁であった (データを示さず) ^{13, 14)}.

トリプタミン系では調べた7ドラッグすべてが作用を示したが、5-MeO-DMTが最も強く、5MeO-DALTと5-MeO-DIPTが続き、AMT・5-MeO-AMT・DPT・5-MeO-MIPTでは10⁻⁴ Mでも最大結合値が得られなかった (Table 5, Fig. 7B) . 5-MeO-AMT・5-MeO-DMT・5-MeO-DALTが結合した受容体は、5-HT₁であった (データを示さず) ^{13, 14)}.

ピペラジン系では2種類のドラッグが作用を示し、3CPPのEC₅₀値は10⁻⁷ Mオーダーであるが5-HTの最大活性と比較すると約40%の結合量であり (Table 5) , 4MPPの作用は弱いものであった. 受容体は、いずれも5-HT₁であった (データを示さず) ^{13, 14)}.

4) マイクロダイアリス法

NE・DA・5-HTをそれぞれ10 pg/10 µl含有する混合標準溶液とドラッグを投与したマウスの脳からマイクロダイアリス法により回収した採取試料のクロマトグラムを重ねて示した (Fig. 8) . 白抜きで示した標準溶液の結果からNE・DA・5-HTの保持時間は、それぞれ5.14・6.42・11.34分だった. この標準溶液のピーク比から換算した結果、生体試料中には、NE (赤で示す) が0.357 pg/10 µl, DA (青で示す) が6.955 pg/10 µl, 5-HT (赤で示す) が0.268 pg/10 µl含まれていた.

フェネチルアミン系ドラッグによるNEとDAの経時変化をFig. 9Aに、ピペラジン系に属するドラッグによる5-HTの変化をFig. 9Bに示した. 投与量 (1, 10, 20 mg/kg体重) に依存して、ドラッグ特異的にそれぞれのモノアミン量が増加していた. また、ドラッグにより影響が最大になるまでの時間や、それが持続する時間が異なっていた.

5. スクリーニング試験の評価と展望

違法ドラッグは、多幸感や快感を高め、幻覚や興奮作用があるとされるものであり、中枢神経系に対する様々な作用を持つと言われているが、その効果や作用機構に不明確な部分が多い. 本総説においては、ドラッグの中枢神経系への影響を明らかにするために我々が実施した4種類の試験方法による結果を紹介した.

1) 動物の行動および神経症状を直接観察する試験

社会で乱用されるドラッグは、アップー (興奮) 系・サイケデリック (幻覚) 系・ダウンナー (抑制) 系およびそれらの作用を混在して示すものに分けられるが、実験動物を用いて作用様式や作用強度を比較することによって、調べたドラッグを分類することが可能である. 我々の開発した試験法においては、実験動物を使用して高用量のドラッグを投与することによって、低用量で発現しない行動および神経症状が検出でき、特に新たな未規制物質の情報を迅速かつ簡便に数値化して客観性を持たせた点で意義が大きい. また、5匹の動物を並べて同様な症状の発現を目視で確認することは、運動量や反復する常同行動ばかりでなく、微

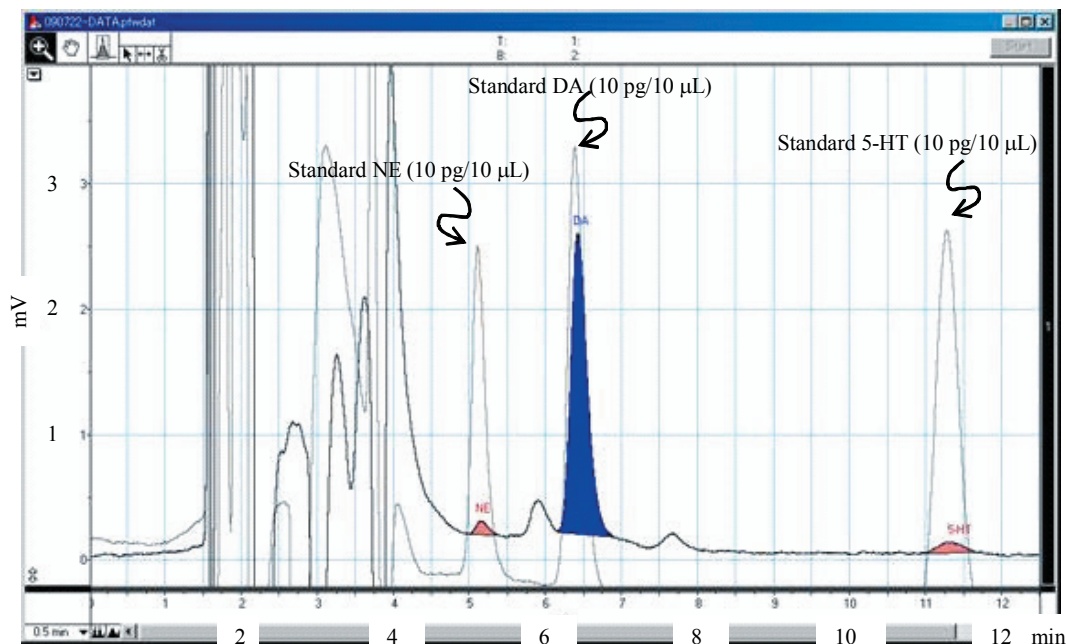


Fig. 8. HPLC-ECD Chromatograms of NE, DA, 5-HT standard (each 10 pg/10 µL) and extracellular sample in mice striatum (red and blue shade).

Detection limit, DA=0.05 pg; NE, 5-HT=0.1 pg. Column : EIKOMPAK CAX, Mobile phase: 30% methanol-sodium aulfate-50 mg/L EDTA-2Na in 0.1 M ammonium acetate Buffer (pH 6.0), Mobile phase flow rate: 250 µl/min, Analysis temperature: 35°C, Working electrode: graphite electrode, Reference electrode: Ag/AgCl, Setting voltage: +450mV vs. Ag/AgCl.

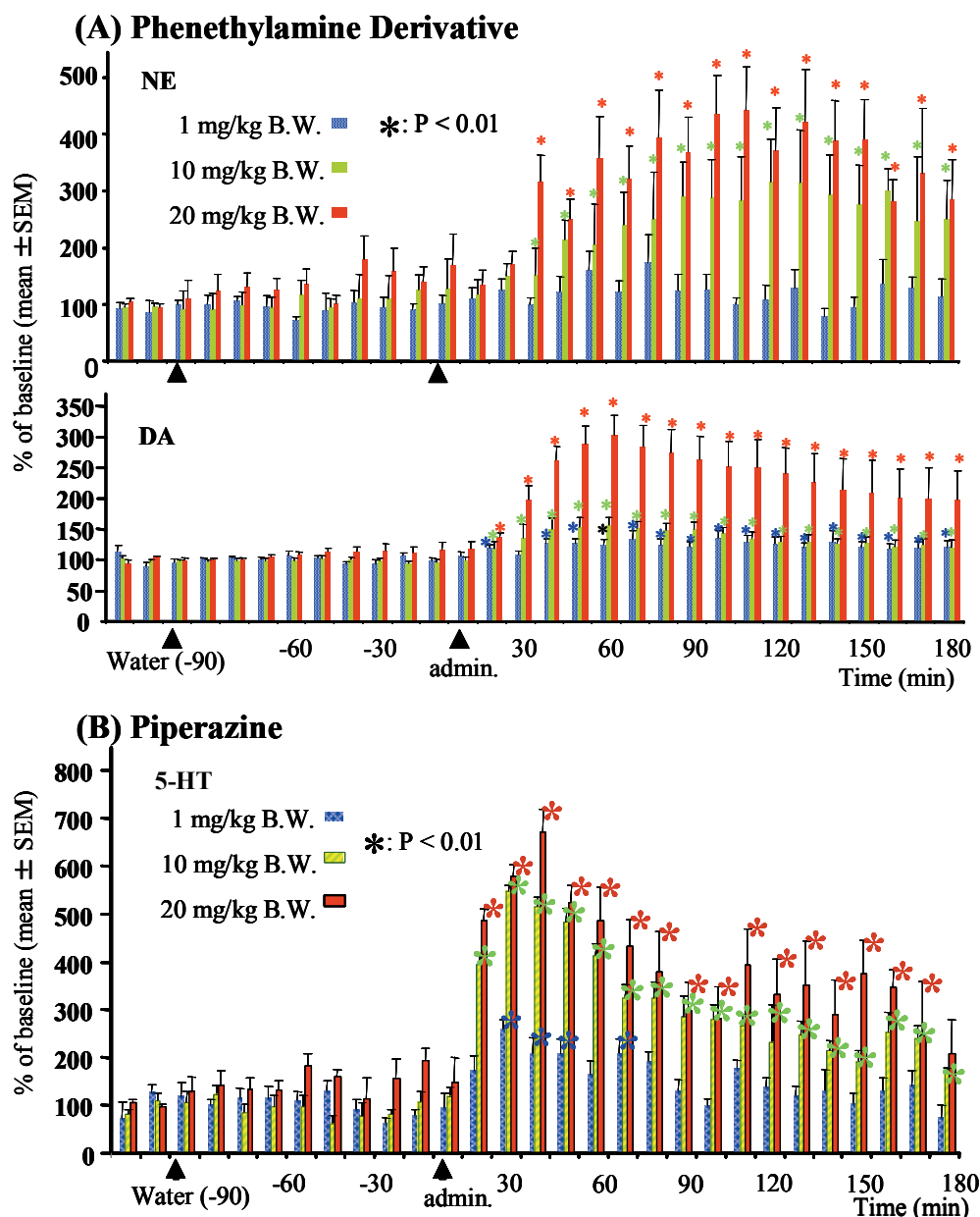


Fig. 9 Mice striatal NE, DA and 5-HT response to single oral administration of illegal drugs. (A) Effects of phenethylamine derivative on the NE and DA. (B) Effects of piperazine derivative on the 5-HT. B.W., body weight.

細な症状変化をも捉えることも容易にした。さらに、動物へ経口的に投与して得られた結果は、同様の経路で服用するヒトの状況に外挿することが可能である。違法ドラッグは、中枢神経系へ作用することにより、行動や症状の変化として観察されることが多いが、GHBや亜硝酸エステル類のように中枢神経系に直接作用しないで筋や循環器系に影響をおよぼす化合物もある。我々開発した試験法は、動物の神経に対する作用を包括的に観察するため、多様な原因に基づく種々の症状観察が広範囲に行える。ただし、観察者の負担を軽くして実用性を高めるという観点からは、将来的に観察項目を削減することが望ましいものと考えられる。例えば、外界反応・痛反応・払いのけ反射・耳介反射等は、知覚異常による共通した同傾向の作用と考えられ、統廃合

が可能である。一方、本試験の信頼性を高めるためには、当然ながら、観察者の観察力を向上させることが重要である。

2) 動物の行動量を数値データとして測定する試験

自発行動は時間経過とともに行動量が減少していくので、MAPのように興奮作用をもったドラッグは感度が高く検出できるが、ドラッグ投与後早い時期から抑制作用が現れるGHB以外の抑制系ドラッグについては検出力がやや劣る傾向がある。つまり、行動に量的な変化を及ぼすドラッグに関しては高い検出力を示すが、行動に質的な変化を与えるが量的な変化を伴わない幻覚系や抑制系ドラッグに関しては影響を測ることが難しいと思われる。また、今回は

雄性マウスのみを試験に供したが、違法ドラッグは男女問わず乱用される実態があるので、雌性動物を使った試験により性差について検討する必要がある。ただし、雌性動物の場合には、性周期によりドラッグへの反応性が異なることが考えられるので、投与時期や測定個体数のさらなる増加を検討する必要があると思われる。

3) 3種類の神経伝達物質 (DA・5-HT・NE) に対してどのように影響するのかを調べる *in vitro* 試験

陽性対照としたcocaine (モノアミン再取り込み阻害剤) とMAP (モノアミン遊離促進剤) の IC_{50} および EC_{50} 値は、既報^{22, 26, 27)}とほぼ同値である。また、G-タンパク活性化測定方法ではモノアミン類の用量作用曲線が既報^{28, 29)}とほぼ一致しており、さらにcocaineとMAPにG-タンパク活性化作用は認めない。これらの結果から、我々の開発した*in vitro*の3試験法は興奮系ドラッグの前シナプス (再取り込み阻害作用、遊離促進作用) および後シナプス (G-タンパク結合作用) 側におけるドラッグのモノアミン神経伝達系に及ぼす影響について、1回の測定で5種類のドラッグの作用を迅速に調べる事ができ、効率が良く、再現性にも優れた方法である。

化学系ドラッグは、Fig. 2にその化学構造を示したように、麻薬や覚せい剤の構造を類似させて合成されたもの (デザイナーズドラッグ) である。我々の開発した*in vitro*試験法は、デザイナーズドラッグの中樞神経系への影響の差異を明らかにできる。例えば、MAPのデザイナーズドラッグとして開発されたものがフェネチルアミン系ドラッグであり、メチレンジオキシ基を有するMDMA・methylenone・BDB・MBDB・MDPVは、DA作動性神経伝達系においてMAPより影響が弱い、5-HT作動性神経伝達系に及ぼす作用がそれより強く、さらにアミノ基の分子量が大きくなるほどMAPより取り込み阻害作用が強くなるが、遊離促進作用が非常に弱くなる。結果の1-1)項において述べたように、一般的に示されているMDMAのヒトでの使用量は、MAPやMDPVの約10倍に当たる100 mg/1回である。しかし、我々が明らかとしたように、MDMAの再取り込み阻害および遊離促進作用におけるDAへの影響はMAPより弱い、5-HTに対する影響はMAPより約10倍強い。従って、一般的使用量のMDMAが示すと予想される作用強度は過小評価されている恐れがあり、非常に危険である。また、MAPのベンゼン環を置換したメチレンジオキシ基の有無や、メトキシ基の数によっても神経伝達系への影響作用が少しずつ異なっている。一方、AMTのデザイナーズドラッグとして開発されたトリプタミン系ドラッグに関しては、再取り込み阻害作用や遊離促進作用の強さが、5位にメトキシ基を有するか否かで異なり、さらに側鎖アミンの分子量が大きくなるに従って作用が消失していく。調べたすべてのトリプタミン系ドラッグは、G-タンパク活性化作用を有しているが、AMTより5-MeO-AMTの方が作用が強い。動物に投与した行動観察結果において、5-MeO-AMTの方がAMTより強い傾向を認

めたのは、生体内でこれらの作用が複雑に絡み合った結果であるものと考えられる。これに対して、ピペラジン系ドラッグについては、一定の長さのピペラジン側鎖が、G-タンパク活性化作用に起因している可能性がある。G-タンパク結合作用測定においては界面活性剤サポニンで処理し緩衝液にDPCPXを加えることによりDA・5-HT・NEの3種類の受容体を同時に認識するシナプトソームの精製に成功しているが、5-HT受容体に関して各種のアнтаゴニストを作用させた結果から用いたシナプトソームは5-HT₁を認識しているが5-HT₂を認識していない。TMAとTMA-2のように5-HT₂受容体を認識していると報告されている³⁰⁾ドラッグもあるので、DA・5-HT₁・5-HT₂・NE受容体を同時に認識するシナプトソームを精製することが今後の課題である。これら*in vitro*試験法の結果は、5-1)および2)節の方法で実施した動物の行動や神経症状と一致し、新たに出回る可能性があるデザイナーズドラッグに対しても、ヒトへの作用を予想できるスクリーニング法である。さらに、複数のドラッグを混和した、いわゆるカクテルドラッグや、最近の薬事法の一部改正によって、化学系ドラッグの取締りが厳しくなったために増えてきた植物系ドラッグについても、中枢神経系に及ぼす影響を検索する上で有用な方法である³¹⁾。

この様に*in vitro*試験法は感度・再現性・効率性の点で、また、数 μ gのドラッグ量で結果を得られる点で有用であるが、この試験法は現在のところアイソトープ (以下RIと略す) を使用しているため実施できる施設に限られる。今後は、RIを使用しないでも同等の感度等が得られる方法も開発する必要がある。

4) どの神経伝達物質にどの程度影響しているのかを調べるマイクロダイアリシス法

マイクロダイアリシス法で得られたクロマトグラム (Fig. 8) は、線条体からの生体試料にDA量が最も多いことを示している。これは、線条体にはDA作動性神経細胞からの軸索終末が最も多く存在していることに起因している。軸索終末の多くは、黒質緻密層に存在するDA作動性起始細胞からのもので、黒質線条体DA神経系といわれ、運動量を制御している。線条体内の神経細胞外DA量増加は運動量を増加させ、逆にパーキンソン病にみられるようなDA量の減少は運動量を極端に減少させることが知られている³²⁾。我々の開発した方法で試験した結果、線条体内の神経細胞外DA量を増加させるドラッグは、行動量の増加を引き起こすことが明らかとなり、5-1)および5-2)で述べた試験結果によっても証明されている。

生体試料中に含まれるNEと5-HTの量は通常DAの10分の1以下と極微量であるが (Fig. 8)、ドラッグによってはこれらの量を増加させる (Fig. 9) ので、これらの神経伝達物質作動性神経への作用は十分に検出可能である。データを示さないが、我々は、マイクロダイアリシス法を用いて、DA量を約170%、5-HT量を3,200%と著明に増加させるドラッグを検出しており³³⁾、5-3)で述べた*in vitro*試験法による

結果とも一致している。以上のことから、マイクロダイアリシス法は、ドラッグ類の作用を調べるのに有効である。なお、受容体に直接結合するドラッグは本試験法で判定できないために、本年報掲載の別論文においてはそのようなドラッグを対象とする片側パーキンソンマウスを用いた試験³⁴⁾を紹介しているが、今後も新たな試験法の開発が必要であると考えている。

おわりに

本総説で紹介した試験を実施することにより、ドラッグのヒトにおける作用を類推すること、さらに化学構造が明らかになったドラッグについて、現在までのデータの蓄積からそれらの作用を大まかに予想することが可能である。国が薬事法の一部を改正した後も、東京都薬事監視課は、我々のデータも含めて委員会の答申として、未規制ドラッグについて国へ情報提供している。それにより、MDPVを含む幾つかのドラッグが薬事法指定薬物や麻薬として新たに指定された。最近、植物系ドラッグが多くなってきているが、本総説で紹介した、我々が開発した4つの系を用いて既存の麻薬や覚せい剤の作用と比較することで、植物系ドラッグについても、ヒトにおける作用が推定可能であると考えている。今後も新たな試験法の開発が必要であることを最後に述べる。

文 献

- 1) http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/soumu/fkhk/2005/0504/0504_2.html (2009年8月20日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 2) <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/yakuji/kansi/datura/tijisitei/tijisitei.html> (2009年8月20日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 3) <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H19/H19F19001000014.html> (2009年8月20日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 4) 田所作太郎: 薬物と行動, 1-58, 1980, ソフトサイエンス社, 東京.
- 5) 田中豊人, 市川久次: 東京衛研年報, **44**, 265-267, 1993.
- 6) 田中豊人, 市川久次: 東京衛研年報, **45**, 188-190, 1994.
- 7) Tanaka, T.: *Toxicol. Lett.*, **69**, 155-161, 1993.
- 8) Tanaka, T.: *Reprod. Toxicol.*, **9**, 281-288, 1995.
- 9) Gough, B., Imam, S.Z., Blough, B., *et al.*: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **965**, 410-420, 2002.
- 10) Kuczenski, R. and Segal, D.: *J. Neurosci.*, **9**, 2051-2065, 1989.
- 11) Kuczenski, R. and Segal, D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 876-883, 2001.
- 12) Nagai, F., Nonaka, R., Satoh, K., *et al.*: *Eur. J. Pharmacol.*, **559**, 132-137, 2007.
- 13) Nonaka, R., Nagai, F., Satoh, K., *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2328-2333, 2007.
- 14) 佐藤かな子, 野中良一: 薬誌, **128**, 1771-1782, 2008.
- 15) White, S.R., Obradovic, T., Imel, K.M. *et al.*: *Prog. Neurobiol.*, **49**, 455-479, 1996.
- 16) 福森信隆, 田中豊人, 安藤 弘, 他: 日本薬学会第125年会講演要旨3, 108, 2005.
- 17) Irwin, S.: *Psychopharmacologia*, **13**, 222-257, 1968.
- 18) 松本欣三, 蔡兵, 中村晋也, 他: 日薬理誌, **96**, 31-39, 1990.
- 19) Matsumoto, K., Cai, B., Sasaki, K., *et al.*: *J. Pharmacol. Methods*, **24**, 111-119, 1990.
- 20) Mikami, Y., Toda, M., Watanabe, M., *et al.*: *J. Neurosurgery*, **97**, 142-147, 2002.
- 21) Fleckenstein, A.E., Metzger, R.R., Wilkins, D.G., *et al.*: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 834-838, 1997.
- 22) Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C. M., *et al.*: *Synapse*, **39**, 32-41, 2001.
- 23) Rothman, R.B., Clark, R.D., Partilla, J.S., *et al.*: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 1191-1199, 2003.
- 24) 不破達, 福森信隆, 田中豊人, 他: 東京健安研セ年報, **58**, 287-292, 2007.
- 25) 山本経之, 植木昭和: 中枢神経系, 福原武彦, 小野 宏編, 機能毒性学, 21-30, 1989, 地人書院, 東京.
- 26) Cunningham, K.A., Callahan, P.M., *Psychopharmacology*, **104**, 177-180, 1991.
- 27) Fleckenstein, A.E., Gibb, J.W., Hanson, G.: *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 1-13, 2000.
- 28) Geurts, M., Hermans, E., Maloteaux, J.-M.: *Life Sci.*, **65**, 1633-1645, 1999.
- 29) Rinken, A., Finnman, U.-B., Fuxe, K.: *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 155-162, 1999.
- 30) Titeler, M., Lyon, R.A., Glennon, R.A.: *Psychopharmacology*, **94**, 213-216, 1988.
- 31) Satoh, K., Nonaka, R., Ohashi, N., *et al.*: Abstract of papers, the 129th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, No 3, 276, 2009, Pharm. Soc. Japan, Tokyo.
- 32) DeLong, M.R.: *Trends Neurosci.*, **13**, 281-285, 1990.
- 33) 不破達, 小縣昭夫, 田中豊人, 他: 日本薬学会第128年会講演要旨集3, 121, 2008.
- 34) 不破達, 児玉亨, 本多芳子, 他: 東京健安研セ年報, **60**, 275-280, 2009.

Development of Assay Systems to Detect and Evaluate the Biological Effects of (Potentially) Illegal Drugs

Kanako SATOH*, Nobutaka FUKUMORI*, Ryuichi NONAKA*, Tatsu FUWA* and Toyohito TANAKA*

In April 2005, the Tokyo Metropolitan Government enacted an “Ordinance concerning the abuse prevention of the drugs”, which prohibits the manufacture, cultivation, sales, possession, use, and other similar factors relating to such drugs. In order to contribute to these measures, we have devised simple, reproducible assay systems that test the neuro-behavior of mice, their spontaneous behavior using an animal movement analyzing system, the re-uptake and release of monoamines and G-protein binding in isolated rat brain synaptosomes, and the amount of neurotransmitters in mouse brains to detect and evaluate the biological effects of (potentially) illegal drugs. As illustrated in this review, these assay systems can assist in the designation of such drugs as prohibited substances, in accordance with the criteria set forth by the Tokyo Metropolitan Government.

Keywords: illegal drug, behavior, neural symptom, neurotransmitter, re-uptake, release, G-protein binding, microdialysis, spontaneous behavior, animal movement analyzing system

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan