

危険ドラッグの生体影響を評価するための新たな試験方法

猪又 明子^a, 小野 恭司^b, 小縣 昭夫^c, 多田 幸恵^b, 湯澤 勝廣^b, 長澤 明道^b,
安藤 弘^b, 久保 喜一^b, 高橋 博^c, 海銚 藤文^b, 田中 和良^b, 星川 典子^b

東京都は、平成17年4月に「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を施行し、これまでに多くの危険ドラッグに使用される成分を知事指定薬物として規制してきた。東京都健康安全研究センターでは、平成17年から危険ドラッグの生体影響試験を実施し、未規制薬物を知事指定薬物として規制するための評価資料を提供してきた。当センターで実施している試験として、マウスを用いた行動及び神経症状観察試験、自発運動量測定、*in vitro*試験（ラット脳シナプトソームを用いたモノアミン再取り込み阻害作用及び遊離促進作用、G-タンパク結合作用の測定）、マイクロダイアリシス法によるマウス中枢神経内モノアミン量の測定試験、薬物依存性を評価する試験として薬物自己投与試験、条件付け場所嗜好性試験、薬物弁別試験について、それぞれの試験の概要と危険ドラッグの作用について解説する。しかし、これらの試験方法で評価できない薬物の流行や、実験施設の閉鎖等により、新たな試験方法の開発が必要となったことから、合成カンナビノイドを含有するハーブ系ドラッグの生体影響を調べるための吸入ばく露試験方法を開発した。また、ラジオアイソトープ実験施設の閉鎖により、ラット脳シナプトソームを用いた神経伝達物質モノアミンの再取り込み阻害作用等を測定する*in vitro*試験を実施できなくなったことから、動物を用いず、ラジオアイソトープも使用しない新たな試験への適用を目指してモノアミントランスポーターの安定発現細胞株を作製し、その妥当性を確認した。これらの方法は東京都薬物情報評価委員会において、未規制の危険ドラッグを知事指定薬物として規制するために用いられている。

キーワード：危険ドラッグ，吸入ばく露，神経症状行動観察，合成カンナビノイド，マウス，神経伝達物質モノアミン，HEK293細胞，再取り込み阻害

はじめに

東京都は、平成17年4月に「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を施行し、これまでに多くの危険ドラッグに使用される成分を知事指定薬物として規制してきた。知事指定薬物の指定に際して、諮問機関として東京都薬物情報評価委員会（以下委員会と表記）を設置し、この委員会においてドラッグの構造や生体影響に関するデータを評価している。東京都健康安全研究センター（以下当センターと表記）では、マウスを用いた行動及び神経症状観察試験^{1,4)}、自発運動量測定^{3,4)}、マイクロダイアリシス法によるマウス中枢神経系内モノアミン量の測定^{3,5)}、ラット脳シナプトソームを用いたモノアミン再取り込み阻害作用の測定^{3,6)}、モノアミン遊離促進作用の測定^{3,6)}、グアニンシクレオチド結合タンパク質（以下G-タンパクと表記）結合作用の測定^{3,7)}を実施し、委員会にデータを提供してきた。これらの試験方法の詳細については、既報³⁾を参照されたい。

本稿では、危険ドラッグの生体への作用と、危険ドラッグ生体影響試験の概要について解説する。また、これまでとタイプの異なる危険ドラッグの出現や、実験施設閉鎖に伴って開発した、新たな生体影響試験についても報告する。

新たに開発したこれらの方法は、委員会において未規制の薬物を知事指定薬物として指定するための生体影響試験として、その適用が承認されたことから、各試験方法について詳述するとともに、知事指定薬物として規制された薬物の試験結果例を紹介する。

危険ドラッグの作用と生体影響試験の概要

1. マウスを用いた行動及び神経症状観察試験、自発運動量測定

危険ドラッグは、新たに流通及びその濫用が確認された未規制薬物であり、麻薬や覚せい剤と類似の作用を示す化学物質や植物の総称である⁸⁾。したがって、危険ドラッグは麻薬や覚せい剤と同様に脳内の様々な神経伝達物質のバランスを崩し、その結果として多幸感や高揚感、幻覚等の症状を引き起こす。

実験動物における、これらの症状を確認するために、行動薬理学を応用したマウスの行動及び神経症状観察試験^{1,4)}を実施している。行動薬理学により、実験動物が現す行動や神経症状の観察結果から、ヒトの神経系への作用を類推することができる⁹⁾。このため、Irwinの多元観察法¹⁰⁾を基本としながら、複雑で観察の評価に熟練を要する点を改良

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科

^c 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科

し、迅速かつ簡明な観察評価が可能となる点数法¹¹⁾（行動及び神経症状観察試験）を平成17年に考案した。

これまで実施している行動及び中枢・自律神経症状観察の得点表⁴⁾の各観察項目においては、ドラッグを投与しない陰性対照の動物の行動を0とし、抑制・鎮静作用の認められるものをマイナスに、興奮・亢進作用の認められるものをプラスに、作用強度に応じて3段階の得点を与えることにより、ドラッグが各観察項目に与える影響を明らかにしている。

もう一つのドラッグ中枢神経作用の解析方法として、運動機能への影響を調べる方法がある。たとえば、覚せい剤のような中枢興奮作用を有するドラッグでは、著しい運動量の増加が確認される⁸⁾。そこで、小動物運動解析装置

（SCANET CV-40, メルク）を用いて、マウスの自発運動量を測定し、ドラッグ投与群と陰性対照群との運動量を比較している^{3,4)}。測定項目は、総運動量（10分間にセンサーを横切った回数）、大きい運動量（1回の移動距離が3cm以上で10分間にセンサーを横切った回数）、総移動距離（10分間の移動距離の和）、立ち上がり回数（10分間の立ち上がりの回数）である。新たな環境に置かれたマウスは、探索行動と呼ばれる歩き回りや、嗅ぎ、舐め、停止、立ち上がり等の多様な動作を示す。探索行動は、マウスが新たな環境に置かれた直後に多く見られ、時間の経過とともに減少するが、覚せい剤のメタンフェタミンを投与されたマウスでは、探索行動の指標の一つである移動量が用量依存的に増加することが報告¹²⁾されている。このように、興奮作用を持つドラッグについては、陰性対照動物との比較により、明らかな影響が見られる。一方、鎮静作用あるいは幻覚作用を示すドラッグでは、陰性対照との違いが明確でないことが多い。

2. *In vitro*試験（ラット脳シナプトソームを用いたモノアミン再取り込み阻害作用及び遊離促進作用、G-タンパク結合作用の測定）

脳内の神経ネットワークの基本単位はニューロンであり、ニューロン同士のつなぎ目は狭い隙間（シナプス）になっている。ニューロンの末端（前シナプス）から神経伝達物質が放出され、次のニューロン（後シナプス）の受容体に結合することにより、興奮が伝わる。後シナプスに興奮が伝わった後、シナプス間隙に残った神経伝達物質は前シナプスのトランスポーターにより速やかに取り込まれ（再取り込み）、興奮が治まる。神経伝達物質は、種類ごとに産生される神経が限定されており、産生する神経伝達物質名を付けて、たとえばドーパミン（以下DAと表記）を合成する神経は「DA作動性神経」と呼ばれる。精神に作用する薬物の多くは、DA、セロトニン（以下5-HTと表記）、ノルアドレナリン（以下NAと表記）作動性神経系に影響を与えることが知られている。前シナプス側では、ドラッグによるモノアミン（DA, 5-HT, NA）の再取り込み阻害作用及び遊離促進作用が、シナプス間隙での神経伝達物質

濃度を増加させ、興奮作用をもたらす。後シナプス側では、ドラッグが直接受容体と結合し、G-タンパク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¹³⁾。

そこで、ドラッグによる前シナプス側におけるモノアミンの再取り込み阻害作用及び遊離促進作用、後シナプス側におけるG-タンパク活性化作用を測定するために、ラット脳シナプトソームを用いた*in vitro*試験を平成17年に開発し、実施してきた^{3,6,7,13)}。試験の詳細は既報¹³⁾のとおりである。ラット脳シナプトソームを用いたモノアミンの再取り込み阻害作用、遊離促進作用、G-タンパク活性化作用の測定には、いずれも放射性同位元素を使用することから、これらの試験はラジオアイソトープ（以下RIと表記）実験施設内で実施してきた。

3. マイクロダイアリス法によるマウス中枢神経系内モノアミン量の測定試験

ドラッグによる再取り込み阻害作用あるいは遊離促進作用により増加した脳内モノアミンの濃度を測定するために、マイクロダイアリス法によるマウス中枢神経系内モノアミン量の測定試験を平成18年から危険ドラッグに適用してきた^{3,5)}。脳内の線条体には、ほとんどの伝達物質作動性神経の軸索終末が形成されており、黒質のDA作動性神経、縫線核の5-HT作動性神経、大脳皮質のグルタメート作動性神経、線条体内の介在神経であるアセチルコリン作動性神経、青斑核のNA作動性神経などの神経終末が存在している¹⁴⁾。したがって、実験動物の線条体に刺入したマイクロダイアリス・プローブから神経伝達物質モノアミンを含む試料を経時的に回収するマイクロダイアリス法（微量透析法）とHPLC-ECDとを組み合わせることにより、生きた実験動物を無拘束に近い自由行動下において、ドラッグ投与前から投与後の時間経過に伴うモノアミン量の変化を測定することができる。この方法を用いて、ドラッグ投与前のモノアミンレベルと比較した投与後の濃度変化を、経時的に測定することにより、ドラッグによるモノアミンの種類別の作用の強弱及び作用時間を評価することができる。

4. 薬物依存性を評価する試験

危険ドラッグの乱用危険性を予測する試験方法として、薬物依存性を評価する試験がある。当センターでは実施していないが、多くの大学や研究機関で実施されていることから紹介する。

薬物依存とは、薬物摂取による多幸感や陶酔感を経験し、薬物乱用を繰り返すことにより「自己制御が困難になった生物学的状況」のことである^{8,15)}。薬物依存には、薬物を摂取したい渴望状態にある「精神依存」と、薬物が生体内に存在する状態に適応し、断薬すると退薬症状が生じる「身体依存」に分類される^{8,15)}。薬物依存の形成においては、精神依存が基礎となることから、動物における薬物摂取行動や報酬効果の解析により、薬物依存性を評価する試

験が開発されている^{16, 17)}。

1) 薬物自己投与試験

薬物の精神依存形成能を評価する方法の中で、もっとも信頼性の高い方法とされているのが、薬物自己投与試験である^{8, 15, 18, 19)}。本法は、動物が自らの意思で「レバーを押す」ことにより、薬物を自由摂取させる方法であり、一定の時間内に摂取した頻度が薬物依存性のパラメーターとなる⁸⁾。薬物の摂取行動の強化効果を評価する試験であり¹⁵⁾、強化効果の有無により、薬物の精神依存形成能を予測することができる¹⁹⁾。ヒトで乱用される薬物の多くが実験動物でも自己投与されること、動物による薬物摂取パターンがヒトの場合と対応させることが可能であることなどから、精神依存に関わる研究に繁用されてきた^{15, 20)}。

2) 条件付け場所嗜好性試験

条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned place preference paradigm, 以下CPP法と表記) は、薬物の精神依存性を報酬効果から予測する方法¹⁵⁾である。CPP法により評価される薬物の報酬効果と、自己投与法における薬物の強化効果がよく対応することから、薬物の報酬効果から精神依存形成能を予測することが可能であると考えられている^{15, 19)}。1980年代からCPP法を用いた研究がオピオイドを中心に活発に行われるようになり、現在ではCPP法を用いた研究報告が薬物自己投与試験よりもはるかに多くなっている¹⁸⁾。

本法は操作が簡単であり、短時間で評価できることから、広く利用されている⁸⁾。薬物あるいは生理食塩水を投与した実験動物を特定の環境 (白又は黒の区画) に一定時間 (薬物の作用時間により20~60分間) 閉じ込めることで薬物投与による条件付けを行う^{8, 15, 18, 19)}。たとえば、薬物を投与した動物を60分間白区画に入れ、次の日は生理食塩水を投与して黒区画に60分間入れる。これを6日間繰り返すことにより、条件付けを行う。7日目に何も投与しない動物を、黒及び白区画を自由に移動できる環境に置き、各区画の滞在時間を測定する。依存性薬物であれば快感や多幸福感が得られることから、薬物を投与された動物は、その時に入れられていた白区画の環境と快感等の効果が条件づけられると考えられる⁸⁾。したがって、薬物で条件付けた白区画の滞在時間が延長すれば、その薬物は精神依存形成能を有する危険性があると判断できる⁸⁾。

これまでの研究により、覚せい剤やコカインなどの中枢興奮薬及びオピオイド系の中枢抑制薬では、CPPの発現と薬物自己投与の発現はよく一致することが示されている²¹⁻²⁴⁾。しかし、オピオイド系以外の中枢抑制薬や幻覚薬の報酬効果を評価する場合には、特殊な処置や用量範囲の設定に留意した検討が必要である^{18, 19, 25, 26)}。

3) 薬物弁別試験

薬物弁別試験は、薬物を摂取したときにどのような感覚 (自覚) を示し、どの薬物との類似性があるかを検討する方法である^{15, 28)}。依存性薬物は、それぞれ特異的な感覚自覚効果を持ち合わせており、この自覚効果が快感であれ

ば、それを求めて乱用されることから、自覚効果は依存形成の重要な因子の一つと考えられている²⁷⁾。実験動物では、自覚効果を直接知ることができないことから、薬物の摂取感覚効果を利用した薬物弁別試験が用いられる²⁷⁾。

本法では、2つのレバーが備え付けられたオペラント実験装置を利用する^{15, 27)}。被験薬物投与時には左右いずれかのレバーを、溶媒投与時には他方のレバーを押すと餌などの報酬が与えられる条件下で実験動物を訓練し、被験薬物の自覚効果を確実に弁別できるようにする²⁷⁾。被験薬物と溶媒とを弁別できるように訓練された動物に、いくつかの標準薬物を投与し、被験薬物と溶媒のどちらのレバーを押すかを観察することにより、被験薬物がどの標準薬物と類似した弁別効果 (自覚効果) を有するかを明らかにすることができる^{15, 27)}。

実験動物による薬物弁別試験の結果は、ヒトでの薬物弁別実験成績と類似していることから、ヒトにおける自覚効果に対応すると考えられている²⁷⁾。

新たな試験法開発の必要性

平成21年以降、合成カンナビノイド化合物を含有するハーブ系の危険ドラッグが流行してきた。ハーブ系の危険ドラッグは、*Althaea officinalis* (以下マーマシュマロウと表記) 等の支持植物に合成カンナビノイド化合物をまぶした状態で販売されていることが多く、その使用方法は、危険ドラッグをタバコのように燃焼させて、主流煙を吸引するものである。これまでは、いずれも被験薬物を蒸留水に溶解し、経口投与により試験していたが、合成カンナビノイドは水にはほとんど溶解せず、また有機溶媒に溶解させて実験動物に投与すると、試験結果に有機溶媒による影響が出ることから、経口投与や腹腔内投与により行動及び神経症状を評価することは極めて困難であった。合成カンナビノイドの生体影響評価には、使用実態に近い吸入ばく露試験方法を用いることが適切であることから、危険ドラッグの吸入ばく露試験について文献調査を行ったが、発見に至らなかった。このため、ハーブ系の危険ドラッグの生体影響を評価する吸入ばく露試験を開発する必要性に迫られた。

また、当センター本館建替えに伴い、平成24年3月末にRI実験施設が閉鎖されたことから、モノアミン再取り込み阻害作用、モノアミン遊離促進作用及びG-タンパク結合作用を測定する*in vitro*試験が実施できなくなり、新たな試験が必要となった。そこで、動物を用いず、RIも使用しない新たな試験方法への適用を目指して、ヒトのドーパミントランスポーター (以下DATと表記) の安定発現細胞株及びヒトのセロトニントランスポーター (以下SERTと表記) の安定発現細胞株を作製することとした。

吸入ばく露試験

1. 材料と方法

1) 吸入ばく露装置

吸入ばく露装置は、人工呼吸器 (SN-480-5, シナノ製作

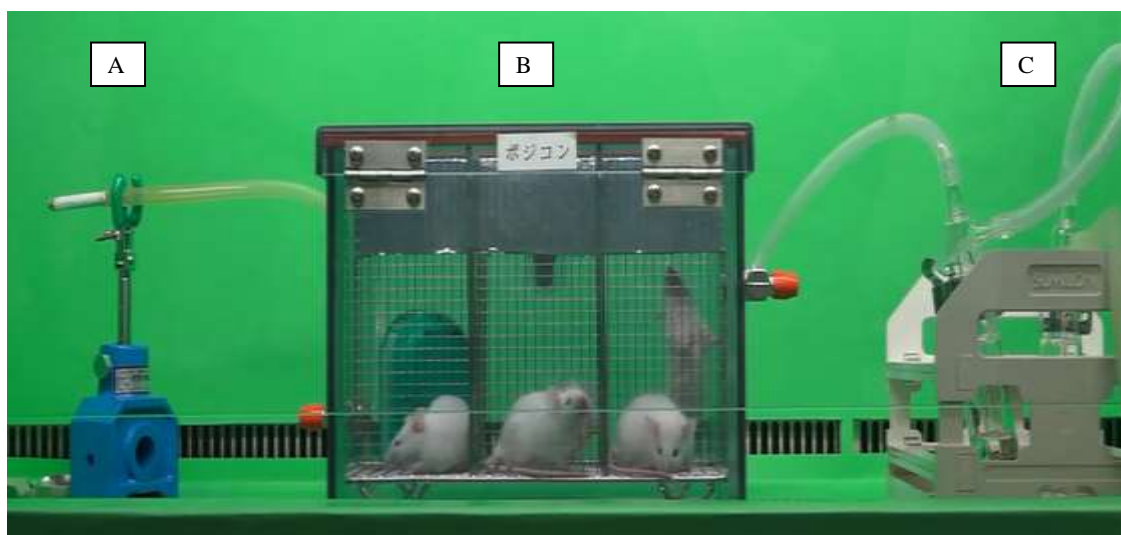


Photo. 1. Inhalation Exposure System

A : Ignition Part, B : Exposure Box, C : Impingers

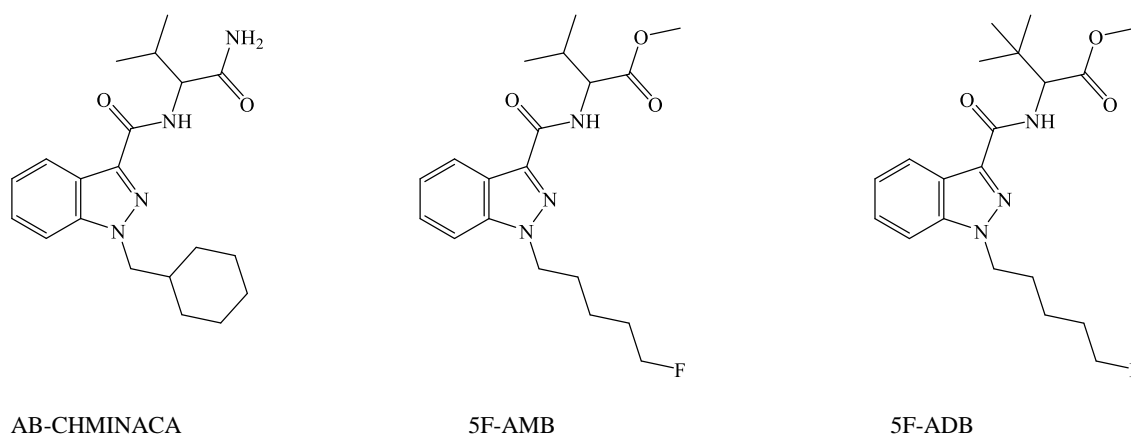


Fig. 1. Chemical Structures of Synthetic Cannabimimetics Dealt as Positive Control

所), 燃烧部, ばく露ボックス (塩化ビニル製, 容量8020 cc, 前田製作所), ガス回収瓶 (SPCミゼットインピンジャー, SIBATA) により構成した (Photo. 1). 燃烧から排気までの空気の流れは以下のとおりである. 燃烧部で燃烧及び気化させた被験物質 (陰性对照, 陽性对照を含む) の主流煙を人工呼吸器で設定した空気量で吸引し, ばく露ボックスの給気口に導入する. ばく露ボックスの給気部にファン (E122535H, アース製薬) を設置し, 流入した煙をボックス内に拡散させる. ばく露ボックス内の煙を人工呼吸器で設定した空気量で排気口から排気する. 排気された煙をアセトニトリル (1本目: HPLC用, 和光純薬) と, ジメチルスルホキシド (2本目: 特級, 和光純薬) の入った2連のガス回収装置でトラップし, 煙中の危険ドラッグ成分を回収した後, 安全キャビネット (HEPAフィルター付) から排気する. 人工呼吸器以外の装置を全て安全キャビネット内に設置し, 燃烧に伴う煙等を安全キャビネットからスクラバー (活性炭付) を経て外気に放出することにより, 試験実施者への薬物のばく露及び環境への放出を防

御した.

2) 陽性对照薬物及び陰性对照

陽性对照薬物として, 平成26年6月に都内で起きた死亡事故において, 事故者が使用していたハーブ系危険ドラッグ製品「総統」(成分はAB-CHMINACA, 5-fluoro-AMB (以下5F-AMBと表記), いずれも平成26年7月15日付けで指定薬物に指定) 及び平成26年9月に15名の死亡事故が発生した「ハートショット」の成分である 5-fluoro-ADB (以下5F-ADBと表記, 平成26年10月29日付けで指定薬物に指定) を用い, 陰性对照として「総統」の支持植物であり, 繁用されているマッシュマロウの葉部 (以下マッシュマロウリーフと表記) を用いた. 「総統」は, AB-CHMINACA及び5F-AMBの2成分を含有することから, 単一成分の陽性对照として, 5F-ADBを用いた.

「総統」の試験量は, 実際の使用量が定かでないため, タバコ1/2本に充てんされる量 (0.25g) を高用量 (AB-CHMINACA : 6.1 mg, 5F-AMB : 38.7 mg) とし, その1/10量 (0.025 g) を低用量 (AB-CHMINACA : 0.6 mg, 5F-

AMB : 3.9 mg) として予備試験を実施した。その結果、低用量ではほとんど影響が見られず、高用量ではばく露中に激しく暴れまわった後、瀕死状態となったことから、この2用量の間に適切な濃度があると考え、AB-CHMINACA 及び5F-AMB をそれぞれ 2 mg及び13 mg含有する0.08 gを試験量とした。

燃焼量は、タバコ両切り用さや紙1/2本を充填する0.25 gとした。「総統」の試験には「総統」0.08 g及びマーシュマロウリーフ0.17 gをさや紙に充てんして使用した。5F-ADBの試験には、5F-ADB 15 mgを添加したマーシュマロウリーフ0.25 gをさや紙に充てんして使用した。陰性対照にはマーシュマロウリーフ0.25 gを使用した。

試験に用いたAB-CHMINACA, 5F-AMB, 5F-ADBの化学構造をFig. 1に示す。

3) 実験動物

CrIj:CD1(ICR)雄マウス(日本チャールス・リバー)を5週齢時に購入し、馴化して6週齢に達した発育良好なもの(体重30~35 g)を試験に使用した。

4) 飼育条件

マウスは、温度23~25°C, 湿度45~55%, 照明午前6時~午後6時, 換気毎時10回(HEPAフィルター経由)の飼育室において、固形飼料CE-2(日本クレア)及び限外ろ過処理した水道水を自由に与え、プラスチックケージに1匹ずつ飼育した。

5) 吸入ばく露

マーシュマロウリーフ(「総統」, 5F-ADBを添加したものも含む)を燃焼させるために、さや紙にこれらを充てんし、吸入ばく露装置の燃焼部に設置した。

マウス5匹を、網で個別に仕切られたばく露ボックス(容量8020 cc)に入れ、ふたを閉めた後、人工呼吸器で毎分600 ccの流速で空気を流入させながら、マーシュマロウリーフを燃焼させた。燃焼終了後も人工呼吸器を運転し続け、ばく露ボックス内の空気が外気とほぼ入れ替わる15分後に、マウスをばく露ボックスから取り出し、生体影響評価のための各試験を実施した。

6) 試験方法

燃焼終了後15分, 30分, 60分の時点で、下記の試験を実施した。なお、体温測定は、ばく露前にも行った。

(1) 行動及び中枢・自律神経症状観察 既述のように、Irwinの多元観察法¹⁰⁾を改良した行動及び神経症状観察得点表を作成し、5匹のスコアの平均値を求めた。

(2) 体温測定 マウス用体温記録計(AD-1687, エー・アンド・デイ)を用いて、マウスの直腸温度を測定した。

ばく露前の体温の $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ を正常範囲とし、正常範囲の下限から 1°C 低下するごとに抑制作用の得点(-1, -2, -3)を、上限から 1°C 上昇するごとに興奮作用の得点(+1, +2, +3)を与え、5匹のマウスの平均値から作用強度を判定した(自律神経症状観察の平均評価値(Table 3)の「Temperature」)。

(3) カタレプシー試験 高さ6.5 cmの金属製の横棒にマ

ウスの前脚をかけ、後脚を台上に降ろして2本足で立たせたまま、動かない秒数を計時した(Photo. 2)。30秒以上動かない場合をカタレプシー陽性とし、最大90秒まで計時した。30秒未満の場合には試験を3回まで繰り返し、3回とも30秒未満で動いた場合はカタレプシー陰性とした。



Photo. 2. Catalepsy Tested Mouse

7) 映像記録

ばく露中のマウスの行動、ばく露後の行動及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験について、特徴的な行動等を映像で記録した。

8) 実験動物の取り扱い

6)に記述した試験は、当センターの動物実験委員会において審査され、承認されたものである。動物実験の実施においては、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、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(平成18年6月1日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物の殺処分方法に関する指針(平成19年環境省告示第105号)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月1日日本学会会議)、東京都動物の愛護及び管理に関する条例(昭和54年条例第81号)に基づき、当センター動物実験実施規程、同実験動物施設管理基準及び標準作業手順書に従って実施した。

2. 結果

1) 行動及び中枢・自律神経症状観察

Table 1-3に、陰性対照のマーシュマロウリーフ、陽性対照の「総統」、5F-ADBを添加したマーシュマロウリーフを燃焼した煙をばく露したマウスにおける行動及び中枢・自律神経症状観察の平均評価値を示した。表中の5F-AEB及びAMB-CHMICAについては、「4. 未規制薬物への適用」で述べる。表中の値が $0.6 \leq \text{絶対値} \leq 0.8$ の範囲であるものはオレンジ色枠で示し、生体影響が疑われるとした。 $1.0 \leq \text{絶対値} \leq 3.0$ の範囲であるものは赤色枠で示し、生体影響があると判定した。

(1) 行動観察 「総統」では、ばく露中に激しい飛び跳ね、口を大きく開く、静止状態と激しい飛び跳ねを繰り返す、呼吸が荒く臉を閉じてぐったりと網壁にもたれ掛か

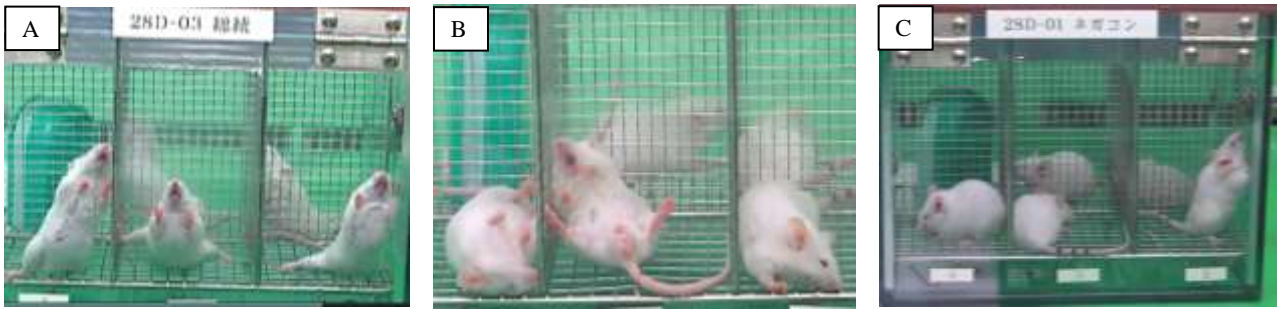


Photo 3. Smoke Exposed Mice

A : SOUTOU, B : 5F-ADB, C : Marshmallow

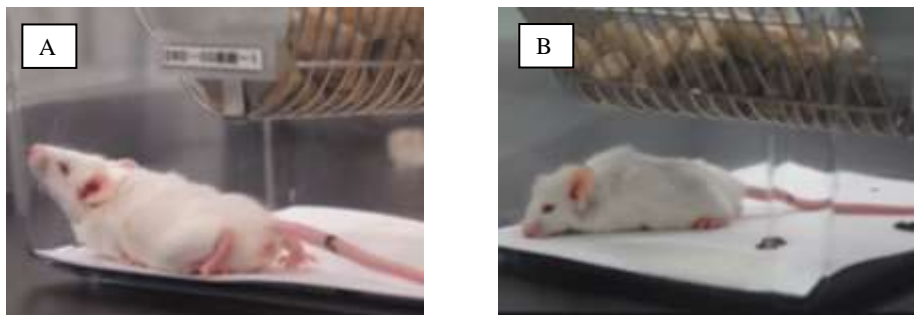


Photo 4. Abnormal Behaviors Observed SOUTOU or 5F-ADB Smoke Exposed Mice

A : SOUTOU, B : 5F-ADB

る様子 (Photo. 3A) が見られた。

5F-ADBでは、ばく露中に激しい飛び跳ねや四肢の硬直、飛び跳ねからの落下横転、不安定な寄り掛かり (Photo. 3B) 等が見られた。

陰性対照では、ばく露開始後に一部の動物が網壁をよじ登ったが、飛び跳ねは見られなかった。さらにばく露を続けると動きが鈍くなり、臉を閉じて静止する状態が見られた。しかし、「総統」及び5F-ADBで見られた脱力感や、体勢の傾きはほとんど認められなかった (Photo. 3C)。

ばく露後15分の観察時には、陰性対照、「総統」、5F-ADBいずれも、洗顔運動が強く抑制されていた。この反応は、陰性対照では時間の経過とともに抑制作用が減弱し、1時間の観察時にはほとんど消失したが、「総統」及び5F-ADBでは1時間の観察時まで強い抑制が続いていた。立ち上がり動作の抑制は、陰性対照においても認められたが、その作用強度は「総統」及び5F-ADBよりも弱かった。特に1時間の観察時では「総統」及び5F-ADBにおいて強い抑制が認められたが、陰性対照では作用が減弱していた。

「総統」及び5F-ADBにおいては、消極性、外界反応、触反応及び痛反応の抑制が認められ、いずれも5F-ADBにおいて、より強い抑制作用が1時間まで見られた。さらに、「総統」においては、攻撃性及び反復動作の亢進が認められた (Table 1)。

(2) 中枢神経症状観察 ばく露後15分の観察時には、陰性対照、「総統」、5F-ADBのいずれにおいても自発運動が抑制されたが、その作用強度は陰性対照では弱かった。自発運動の抑制は、陰性対照では30分の観察時以降はほと

んど消失したが、「総統」及び5F-ADBでは1時間の観察時まで継続して認められた。さらに、「総統」及び5F-ADBでは、ばく露後15分の観察時から異常歩行、異常姿勢 (Photo. 4A,4B)、筋緊張度、正向反射、耳介反射、角膜反射、払いのけ、懸垂力の抑制が認められ、これらの反応は「総統」では時間の経過とともに減弱したが、5F-ADBでは減弱することはなく、いずれのばく露群においても1時間の観察時まで継続して認められた。また、「総統」では、30分の観察時以降に挙尾反応及び指間離開が観察され、5F-ADBでは15分から30分の観察時に痙攣が、15分から1時間の観察時に指間離開が観察された (Table 2)。

(3) 自律神経症状観察 ばく露後15分の観察時には、陰性対照、「総統」、5F-ADBともに、眼裂及び体温に抑制の影響が見られた。陰性対照における体温の低下 (平均2.3°C) は、「総統」での体温低下 (平均3.5°C) や5F-ADBでの体温低下 (平均4.4°C) よりも作用強度が弱く、眼裂の抑制も陰性対照においては15分の観察時のみに見られた。陰性対照では、ばく露後30分の観察時以降、体温の低下 (30分後平均1.8°C, 1時間後平均0.7°C) 以外の反応はほとんど消失した。「総統」及び5F-ADBでは、さらに呼吸数及び心拍数の抑制が見られ、呼吸数及び心拍数の抑制と体温低下がばく露後1時間の観察時まで同程度の作用強度で続いた。「総統」における体温は、ばく露後15分で平均3.5°C, 30分で5.2°C, 1時間で5.9°C低下し、5F-ADBでは15分で平均4.4°C, 30分で6.9°C, 1時間で8.9°C低下した (Table 3)。

2) カタレプシー試験

カタレプシー試験結果をTable 4に示した。陰性対照では、ばく露後15分、30分及び1時間において、全て陰性であった。「総統」では、ばく露後15分及び30分に2匹が陽性、1時間に1匹が陽性となった。5F-ADBは、ばく露後15分ではぐったりして金属棒を掴むことができない、跳ね回る、痙攣を起こすなど、5匹全てが陰性であり、ばく露後30分では2匹が陽性、1時間では4匹が陽性となった。

3. 試験方法の評価

大麻を吸煙した場合、吸煙から数分以内に作用が発現する⁹⁾ことから、危険ドラッグ吸入ばく露試験における行動観察及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験は、燃焼終了後15分、30分、1時間に実施した。マーシュマロウリーフのみを燃焼させた陰性対照においても、洗顔運動の抑制や眼瞼の下垂、体温の低下等が認められたが、それらの作用強度は燃焼終了後15分が最も強く、時間の経過に伴って減弱し、1時間の観察時にはほとんど認められなくなった。それに対し、陽性対照とした「総統」及び5F-ADBでは、燃焼終了後15分から極めて多くの観察項目について、強い作用強度で影響が現れ、1時間の観察時においても強い作用強度を維持していた。

大麻の主要なカンナビノイド成分であるテトラヒドロカンナビノール (Tetrahydrocannabinol, 以下THCと表記) を実験動物に投与すると、体温低下²⁹⁻³¹⁾、自発運動量の低下³⁰⁾、鎮痛³⁰⁾ (すなわち痛反応の抑制)、除脈³⁰⁾ (すなわち心拍数の低下)、攻撃行動²⁹⁾ (すなわち攻撃性の亢進)、カタレプシー²⁹⁻³¹⁾を引き起こすことが知られている。「総統」及び5F-ADBにおいて、体温低下 (ばく露1時間後にそれぞれ平均5.9°C, 8.9°C)、自発運動量の低下 (Table 2)、痛反応の抑制 (Table 1)、心拍数の低下 (Table 3)、カタレプシー (Table 4) が見られ、さらに「総統」において攻撃性の亢進 (Table 1) が観察されたことから、本吸入ばく露試験により合成カンナビノイドに特徴的な薬理作用が確認できると考えられた。

既報³²⁾に述べたように、「総統」の成分であるAB-CHMINACA及び5F-AMBのヒトカンナビノイド受容体CB₁に対するアゴニスト活性 (EC₅₀値) は、それぞれ2.26 × 10⁻¹⁰, 4.23 × 10⁻¹⁰, CB₂に対するEC₅₀値は、それぞれ1.52 × 10⁻¹⁰, 5.45 × 10⁻¹⁰であり、陽性物質であるCP55940 (C-1112, Sigma-Aldrich) のEC₅₀値 (CB₁: 4.17 × 10⁻¹⁰, CB₂: 2.72 × 10⁻¹⁰) と同等レベルの強さを示したことから、「総統」ばく露群の行動及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験で見られた強い作用が裏付けられた。5F-ADBのCB₁, CB₂に対するEC₅₀値は測定していないが、行動及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験の結果から推察すると、AB-CHMINACA及び5F-AMBと同等かそれ以上のアゴニスト活性を示すものと考えられる。

マウスにばく露した後の煙を、有機溶媒を入れたガス回収瓶で捕捉し、燃焼に伴う薬物の変化をネガティブコント

ロールである支持植物(マーシュマロウリーフ)の燃焼由来する成分との比較により検証した³²⁾。合成カンナビノイドは有機溶媒に溶けやすい性質を有するため、1本目のガス回収瓶にアセトニトリルを、2本目のガス回収瓶には燃焼に伴う分解物など広範囲な薬物を溶解させることを目的としてジメチルスルホキシドを使用した。LC/PDAとGC/EI-MSによる分析により、燃焼による薬物分解の有無を確認できることが明らかになった³²⁾。

以上の結果から、マーシュマロウリーフを陰性対照、「総統」及び5F-ADBを陽性対照として用い、ばく露後15分、30分、60分に行動及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験を実施し、かつ煙中の薬物を解析する本吸入ばく露試験は、合成カンナビノイドを成分とするハーブ系危険ドラッグの生体影響を評価するスクリーニング法として、摂取方法に即した有用な試験法と考えられた。

4. 未規制薬物への適用

1) 平成27年度、28年度の知事指定薬物

平成27年度に本法を用いて試験した合成カンナビノイド系未規制薬物は、MO-CHMINACA, CUMLY-5F-P7AICA, CUMLY-BICA, CUMYL-THPINACAの4薬物であり、全て知事指定薬物に指定された。平成28年度には、THJ, 5F-AEB, MDMB-FUBICA, EMB-FUBINACA, APP-CHMINACA, AMB-CHMICA, ADAMANTYL THPINACA, Adamantyl-THPINACA 2-adamantyl isomerの8薬物を試験し、全て知事指定薬物に指定された。

これらの薬物をばく露した例として、平成28年度に知事指定薬物に指定されたTHJ (CAYMAN CHEMICAL製試薬、医薬品研究科で構造及び純度確認) の行動及び中枢・自律神経症状観察とカタレプシー試験の結果について述べる。

2) 行動及び中枢・自律神経症状観察

マウスの行動及び中枢・自律神経症状観察結果をTable 1-3に示す。陽性対照の5F-ADBの添加量と同様に、被験薬物15 mgを0.25 gのマーシュマロウリーフに添加して実施した。

(1) 行動観察 THJばく露による各観察項目への影響は、陽性対照の5F-ADBよりも作用強度が弱く、持続時間も短い傾向が見られたものの、類似の作用が認められた。5F-ADBで観察された外界反応及び痛反応の抑制は認められなかった (Table 1)。

(2) 中枢神経症状観察 THJの結果は、陽性対照よりも作用強度が弱く、持続時間も短かったが、類似の作用が認められた。陽性対照で観察された正向反射の抑制、及び指間離開は認められなかった (Table 2)。

(3) 自律神経症状観察 THJの結果は、陽性対照の5F-ADBよりも作用強度が弱く、持続時間も短い傾向が見られたが、類似の作用が認められた。陽性対照で見られた心拍数の低下は認められなかった (Table 3)。

3) カタレプシー試験

カタレプシー試験結果をTable 4に示す。THJでは、ばく

Table 1. Mean Value of the Score in General Behavior

Group	Observation Time (h)	Observation Items								
		Aggressiveness	Passivity	Stereotypy	Grooming	Vocalization	Sound Response	Touch Response	Pain Response	Verticalness
Marshmallow (Negative Control)	0.25	0	0	+0.2	-2.8	0	0	0	-0.4	-0.6
	0.5	0	-0.6	0	-1.4	0	+0.2	-0.2	-0.2	-1.6
	1	0	-0.6	0	-0.4	0	0	-0.4	-0.2	-0.8
SOUTOU (Positive Control)	0.25	+1.2	-1.8	+1.0	-3.0	0	-1.8	-2.8	-2.4	-1.2
	0.5	+0.8	-1.0	0	-3.0	0	-1.6	-1.4	-1.4	-2.6
	1	+0.6	-1.0	+0.6	-3.0	0	-1.6	-1.0	-0.6	-3.0
5F-ADB (Positive Control)	0.25	+0.2	-2.8	0	-3.0	0	-2.6	-2.6	-2.0	-2.2
	0.5	0	-3.0	0	-3.0	+0.2	-3.0	-3.0	-2.4	-3.0
	1	0	-3.0	0	-3.0	0	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0
THJ (Tested Drug)	0.25	+0.2	-0.6	+0.2	-3.0	0	0	-0.2	-0.4	-1.6
	0.5	+0.2	-0.8	0	-1.0	0	+0.2	-0.8	-0.4	-1.2
	1	0	-0.6	0	-0.4	0	+0.4	-0.4	+0.2	-1.0

Table 2. Mean Value of the Score in Neurological Behavior

Group	Observation Time (h)	Observation Items												
		Spontaneous Activity	Abnormal Gait	Abnormal Position	Muscle Tone	Straub Tail Reaction	Righting Reflex	Pinna Reflex	Corneal Reflex	Tendon Reflex	Tremor	Convulsion	Grip Strength	Detached Finger
Marshmallow (Negative Control)	0.25	-0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0.5	-0.2	0	0	0	0	0	-0.2	0	-0.6	0	0	+0.4	
	1	-0.2	0	0	0	0	0	-0.4	0	+0.2	0	0	0	
SOUTOU (Positive Control)	0.25	-2.0	-3.0	-3.0	-2.0	0	-2.6	-2.2	-2.0	-2.0	0	0	-2.6	
	0.5	-1.8	-2.2	-1.6	-1.6	+0.8	-2.2	-1.0	-1.2	-1.0	0	0	-1.6	
	1	-1.4	-1.8	-1.4	-1.4	+0.8	-1.0	-0.2	-0.8	-0.8	0	0	-1.0	
5F-ADB (Positive Control)	0.25	-2.4	-3.0	-3.0	+2.4	0	-3.0	-2.8	-2.8	-2.8	0	+3.0	-3.0	
	0.5	-3.0	-3.0	-3.0	-2.6	+0.4	-3.0	-3.0	-3.0	-2.8	0	+1.2	-3.0	
	1	-3.0	-3.0	-3.0	-2.6	+0.4	-3.0	-3.0	-3.0	-3.0	0	0	-3.0	
THJ (Tested Drug)	0.25	-0.8	-1.0	-0.8	+0.2	0	0	-0.2	-0.2	-0.4	0	0	-0.8	
	0.5	0	0	0	0	0	0	-0.6	-0.4	-0.6	0	0	+0.2	
	1	0	0	0	0	0	0	-0.2	-0.2	-0.2	0	0	+0.2	

Table 3. Mean Value of the Score in Autonomical Behavior

Group	Observation Time (h)	Observation Items									
		Exophthalmos	Pupil Size	Palpebral Opening	Shed Tears	Salivation	Respiratory Rate	Heart Rate	Piloerection	Temperature	Skin Color
Marshmallow (Negative Control)	0.25	0	0	-1.4	0	0	0	0	0	-2.0	0
	0.5	0	0	0	+0.2	0	0	0	0	-2.0	0
	1	0	-0.2	0	0	0	0	0	0	-0.6	0
SOUTOU (Positive Control)	0.25	0	+0.4	-2.8	0	0	-1.0	-1.0	0	-3.0	0
	0.5	0	0	-0.2	0	0	-1.6	-1.6	0	-3.0	0
	1	0	-0.4	+0.6	0	0	-1.4	-1.4	0	-3.0	0
5F-ADB (Positive Control)	0.25	0	+2.0	-0.6	0	0	-2.0	-2.0	0	-3.0	+1.0
	0.5	0	+1.0	-0.8	0	0	-2.0	-2.0	0	-3.0	-0.2
	1	0	+0.6	-0.8	0	0	-2.0	-2.0	0	-3.0	0
THJ (Tested Drug)	0.25	0	+1.4	0	0	0	-1.0	0	0	-2.6	0
	0.5	0	+0.6	0	0	0	0	0	0	-1.2	0
	1	0	+0.2	0	0	0	0	0	0	-0.4	0

Table 4. Number of Positive Animals in Catalepsy Test

Observation Time (h)	Marshmallow (Negative Control)	SOUTOU (Positive Control)	5F-ADB (Positive Control)	THJ (Tested Drug)
0.25	0	2	0	0
0.5	0	2	2	0
1	0	1	4	0

N=5

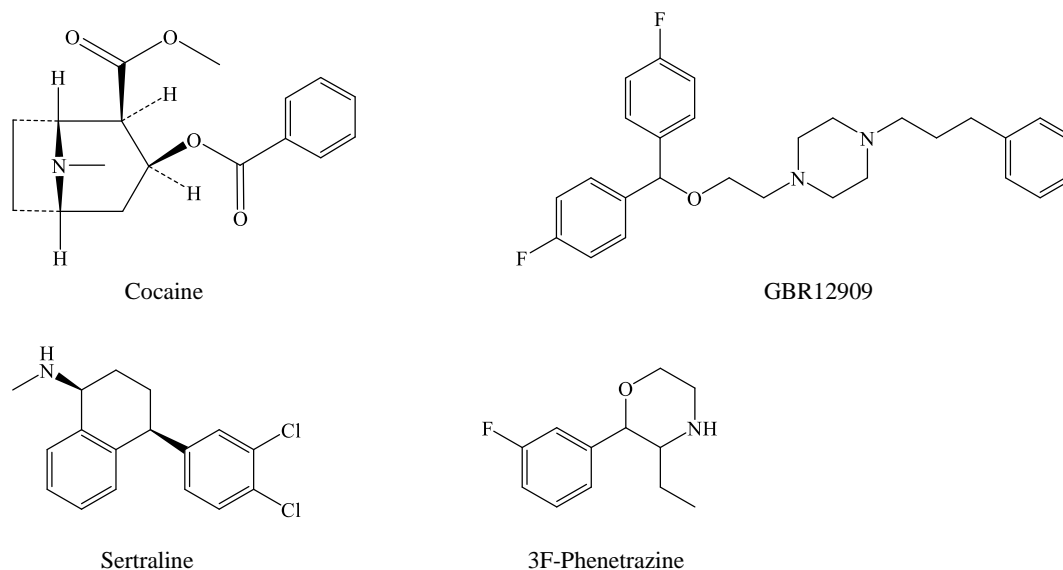


Fig. 2. Chemical Structures of Positive Control, Inhibitors and Tested Drug

露後15分, 30分及び1時間において, 5匹全てが陰性であり, 陽性対照よりも作用が弱いことが示された.

*in vitro*モノアミントランスポーター阻害試験

1. 材料と方法

1) 陽性対照薬物, 選択的阻害剤及び未規制薬物

モノアミントランスポーター阻害試験の陽性対照薬物としてコカイン³³⁾ (塩酸塩, 純度98%以上, 武田薬品工業), DATの選択的阻害剤としてGBR12909³⁴⁾ (二塩酸塩, 純度98%以上, シグマアルドリッチジャパン), SERTの選択的阻害剤としてセルトラリン³⁵⁾ (塩酸塩, 純度98%以上, 和光純薬工業) を使用した. また, 未規制薬物として3F-Phenetrzine (塩酸塩, 純度95%, ナード研究所) を使用した. 各々の化合物の化学構造はFig. 2のとおりである.

2) 細胞及び培地

細胞は, ヒト胎児腎細胞由来株HEK293細胞のゲノム中の転写が起こる部分にFlp Recombination Target (以下FRTと表記) 部位が1箇所含まれているFlp-In-293細胞 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いてDAT又はSERTの安定発現細胞株を作製し, いずれの細胞も培養は37°C, 5% CO₂の条件下で行った.

培地は, 10%透析ウシ胎児血清, 4 mM L-グルタミン,

100 ユニット/mlペニシリン, 及び100 µg/mlストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (以下血清含有DMEMと表記) をベースとして用いた.

3) 目的プラスミドの構築

ヒト DAT cDNA 又はヒト SERT cDNA の pFIK プラスミド (プロメガ) へのクローニングを (財) かずさ DNA 研究所に委託した. 得られたプラスミドについて, 各々制限酵素処理, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ) による精製を行い, 培養細胞への導入に用いる pcDNA5/FRT プラスミド (ハイグロマイシン耐性遺伝子 (開始コドン不含) 含有, サーモフィッシャーサイエンティフィック) にサブクローニングした.

4) 細胞への目的プラスミドの導入

Lipofectamine 3000トランスフェクション試薬 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて, hDAT cDNA又はhSERT cDNAを組み込んだ pcDNA5/FRTプラスミドをpOG44プラスミド (FRTを介する組換えに必要なFlpリコンビナーゼを発現するプラスミド, サーモフィッシャーサイエンティフィック) と共にFlp-In-293細胞に導入した.

始めに, 100 µg/ml Zeocin (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を含む血清含有DMEMを用いてFlp-In-

293細胞を培養した。細胞の状態が安定したところで、血清含有DMEMを用いてポリ-D-リシンコート24ウェルプレートに培養した細胞を、トランスフェクションを行う際に80%コンフルエント以下になるように播種し、一晚培養した。Opti-MEM™培地（サーモフィッシュャーサイエンティフィック）25 µLにつきLipofectamine 3000 Reagent 1.5 µLを加え混和した液と、Opti-MEM培地50 µLにつきhDAT cDNA又はhSERT cDNAを組み込んだ pcDNA5/FRTプラスミド0.1 µg, pOG44プラスミド0.9 µg及びP3000 Reagent 2 µLを加え混和した液を等量混合し、室温で5~10分インキュベートしてDNA-lipid複合体を得た。播種しておいた24ウェルプレートの細胞に、1ウェルあたりDNA-lipid複合体50 µLを加えた。24時間培養後、培地を新たな血清含有DMEM培地に交換し、2日間培養した。pcDNA5/FRTプラスミドが導入されるとZeocin耐性からハイグロマイシン耐性に変化することから、目的以外の細胞を除くために、培地を150 µg/mlハイグロマイシンBを含む血清含有DMEMに変更して培養を続け、細胞を増殖させた。増やした細胞の単一クローンを得るため、ポリ-D-リシンコート384ウェルプレートの1ウェルに1細胞を入れ、細胞を増殖させてDATの安定発現細胞株（以下Flp-DAT細胞と表記）及びSERTの安定発現細胞株（以下Flp-SERT細胞と表記）を樹立した。

5) RNA抽出

Flp-DAT細胞又はFlp-SERT細胞からTRIzol試薬（サーモフィッシュャーサイエンティフィック）を用いてRNA抽出を行った。

6) RT-PCR

モノアミントランスポーター（ノルアドレナリントランスポーター（以下NETと表記）、DAT、SERT）及びアクチンについて、各々のmRNAが発現されていれば約500bpのバンドが増幅されるようにプライマーをデザインした。SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase（サーモフィッシュャーサイエンティフィック）を用いて、逆転写の条件は50°C30分、94°C2分、増幅の条件は94°C15秒、55°C30秒、72°C30秒のサイクルを30回としてRT-PCRを行った。

7) 免疫染色

150 µg/mlハイグロマイシンBを含む血清含有DMEMを用いて、Flp-DAT細胞及びFlp-SERT細胞を培養した。細胞の状態が安定したところで、免疫染色を行う際に70~90%コンフルエントになるようにポリ-D-リシン8ウェルカルチャーライドに培養した細胞を播種し、一晚培養した。カルシウム・マグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝液（以下DPBS(-)と表記）で細胞を洗浄後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で5分固定処理を行った。DPBS(-)で洗浄後、0.2% Triton X-100（シグマアルドリッチジャパン）含有DPBS(-)で10分透過処理を行った。0.1%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート含有トリス塩酸緩衝液（以下TBS-Tと表記）で洗浄後、3%ウシ血清アルブミ

ン含有DPBS(-)で1時間ブロッキングを行った。Flp-DAT細胞はラット抗DAT抗体（200倍希釈、Chemicon）を用いて室温で2時間、Flp-SERT細胞はマウス抗SERT抗体（1000倍希釈、MAb Technologies）を用いて4°Cで一晩、一次抗体処理を行った後、TBS-Tで3回洗浄し、Flp-DAT細胞はロバ抗ラットIgG抗体（Alexa Fluor 488, 500倍希釈、サーモフィッシュャーサイエンティフィック）を用いて室温で1時間、Flp-SERT細胞はロバ抗マウスIgG抗体（Alexa Fluor 488, 2000倍希釈、サーモフィッシュャーサイエンティフィック）を用いて室温で2時間、二次抗体処理を行った。TBS-Tで3回洗浄後、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩（以下DAPIと表記）を用いて暗所で15分核染色を行った。DPBS(-)で洗浄後、プレパラートを作製した。

観察及び撮影は、システム生物顕微鏡（Alexa Fluor 488（DAT又はSERT）及び無染色：510~550 nm, DAPI：420~460 nm, オリンパス）を用いた。

8) モノアミントランスポーター阻害試験

ニューロトランスミッター取り込みアッセイキット（モレキュラーデバイスジャパン）を用いて、モノアミントランスポーター阻害試験を実施した。このキットの測定原理³⁶⁾は以下のとおりである。マスキングされたモノアミン類似物の蛍光ラベルは、細胞内に取り込まれるとマスキングが外れて蛍光を発し、その蛍光強度を測定することにより試験対象物質の阻害作用の強さを求める。例えば、Flp-DAT細胞において試験対象薬物適用後に検出される蛍光強度が小さければ、モノアミン類似物のDATを介しての細胞内取り込みに阻害がかかっていることになる。

始めに、150 µg/mlハイグロマイシンBを含む血清含有DMEMを用いてFlp-DAT細胞及びFlp-SERT細胞を培養し、細胞の状態が安定したところで、96ウェルプレートに細胞を播種（ 9×10^4 細胞/ウェル）し、一晚培養した。培地を取り除き、 1.0×10^{-4} Mから 3.0×10^{-9} Mまで10段階に希釈した陽性対照薬物、選択的阻害剤又は未規制薬物（ $n = 4$ 又は3）を37°C、5% CO₂条件下で30分適用した。適用後、ニューロトランスミッター取り込みアッセイキットを加え、37°C、5% CO₂条件下で30分反応させた後、マイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイスジャパン）により蛍光強度（励起波長：440 nm, 蛍光波長：520 nm）を測定した。陽性対照薬物、選択的阻害剤又は未規制薬物を適用しない細胞の蛍光強度に対する各々の濃度の陽性対照薬物、選択的阻害剤又は未規制薬物を適用した細胞の蛍光強度比（取り込み率）をグラフ化し、取り込み率が50%になる濃度を50%阻害濃度（以下IC₅₀と表記）として求めた。また、選択的阻害剤又は未規制薬物と陽性対照薬物のIC₅₀を比較することにより、阻害作用の強さを求めた。なお、上述の希釈系列で取り込み率が低くIC₅₀を求めることができない場合には、希釈系列を適宜低濃度側に設定して試験を行った。

2. 作製した細胞の新試験への適用妥当性の確認

作製した細胞の*in vitro*モノアミントランスポーター阻害試験への適用に対する妥当性を以下の方法で評価した。

1) 目的 mRNA の発現の確認

Flp-DAT細胞又はFlp-SERT細胞について、NET、DAT、SERT及びアクチンのmRNAの発現をRT-PCRで調べた。Flp-DAT細胞ではDAT mRNA由来及びアクチンmRNA由来と考えられるバンドが500bp付近に認められ、Flp-SERT細胞ではSERT mRNA由来及びアクチンmRNA由来と考えられるバンドが500bp付近に認められた (Photo. 5)。

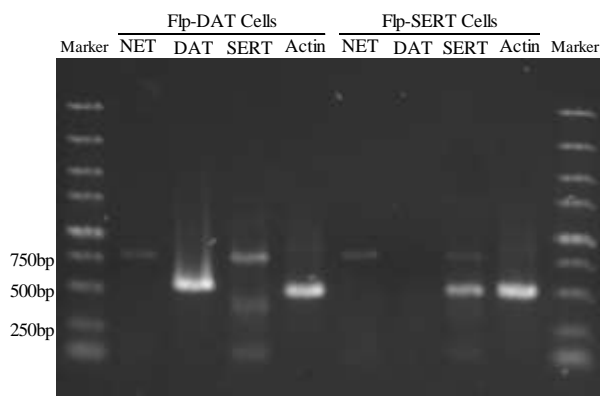


Photo. 5. Expression of Monoamine Transporters mRNA and Actin mRNA in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

2) 目的タンパク質の発現及び局在の確認

Flp-DAT細胞について、抗DAT抗体染色及びDAPIによる核染色を行った。染色を行った細胞では発現したDATタンパク質染色による510~550 nmの蛍光 (緑色) を細胞膜に、DAPI染色による420~460 nmの蛍光 (青色) を細胞内に捉えることができたが、染色を行っていない細胞では510~550 nmの蛍光を捉えなかった (Photo. 6)。

また、Flp-SERT細胞については、抗SERT抗体染色及びDAPIによる核染色を行った。染色を行った細胞では発現したSERTタンパク質染色による510~550 nmの蛍光 (緑色) を細胞膜に、DAPI染色による420~460 nmの蛍光 (青色) を細胞内に捉えることができたが、染色を行っていない細胞では510~550 nmの蛍光 (緑色) が細胞内に弱く捉えられるに過ぎなかった (Photo. 7)。

3) DAT及びSERTに対する選択的阻害剤のIC₅₀の測定

発現させたDAT及びSERTの機能の特異性について調べるため、各々の選択的阻害剤及びコカイン (陽性対照薬物) について*in vitro*モノアミントランスポーター阻害試験を行い、それぞれのDAT及びSERT に対するIC₅₀を求めた。

DATの選択的阻害剤であるGBR12909及びコカインによるFlp-DAT細胞中のDATの阻害に対するIC₅₀はそれぞれ 8.7×10^{-8} M, 2.1×10^{-6} Mであり、Flp-SERT細胞中のSERTの阻害に対するIC₅₀はそれぞれ 2.0×10^{-6} M, 2.1×10^{-6} Mであった (Table. 5, Fig. 3)。

一方、SERTの選択的阻害剤であるセルトラリン及びコカインによるFlp-DAT細胞中のDATの阻害に対するIC₅₀は

それぞれ 3.1×10^{-7} M, 1.4×10^{-6} Mであり、セルトラリンによるFlp-SERT細胞中のSERTの阻害に対するIC₅₀はそれぞれ 5.9×10^{-9} M, 4.9×10^{-6} Mであった (Table. 6, Fig. 4)。

3. 作製した細胞の新試験への適用妥当性の評価

新たに作製したFlp-DAT細胞についてRT-PCRを行った結果、陽性対照であるアクチンのmRNA由来のバンドが検出された上でDATのmRNA由来のバンドが認められたことから、導入したDAT遺伝子によってmRNAが発現していると考えられた。

DATタンパク質は細胞膜に存在することが知られており³⁷⁾、免疫染色においてDATタンパク質由来の蛍光が細胞膜から認められたため、導入したDAT遺伝子によるDATタンパク質が細胞膜に発現していると考えられた。

一方、新たに作製したFlp-SERT細胞についても、RT-PCRを行った結果、陽性対照であるアクチンのmRNA由来のバンドが検出された上でSERTのmRNA由来のバンドが認められたことから、導入したSERT遺伝子によってmRNAが発現していると考えられた。また、SERTタンパク質もDATタンパク質と同様に細胞膜に存在することが知られており³⁷⁾、免疫染色においてSERTタンパク質由来の蛍光が細胞膜から認められたため、導入したSERT遺伝子によるSERTタンパク質が細胞膜に発現していると考えられた。

続いて、Flp-DAT細胞におけるDAT及びFlp-SERT細胞におけるSERTの機能について調べるため、各々の選択的阻害剤によるIC₅₀の測定を行った。DATの選択的阻害剤であるGBR12909によるFlp-DAT細胞中のDATの阻害に対するIC₅₀はコカインによるDATの阻害に対するIC₅₀の0.041倍であり、コカインよりも強い阻害が認められた。また、GBR12909によるFlp-SERT細胞中のSERTの阻害に対するIC₅₀はコカインによるSERTの阻害に対するIC₅₀の0.95倍であり、コカインと同程度の阻害であった。GBR12909はFlp-DAT細胞におけるDATに対して選択的な阻害作用を示し、DATの機能に問題はないと考えられた。

一方、SERT選択的阻害剤であるセルトラリンによるFlp-DAT細胞中のDATの阻害に対するIC₅₀はコカインによるDATの阻害に対するIC₅₀の0.22倍であり、コカインと同程度の阻害であった。また、セルトラリンによるFlp-SERT細胞中のSERTの阻害に対するIC₅₀はコカインによるSERTの阻害に対するIC₅₀の0.0012倍であり、コカインよりも強い阻害が認められた。セルトラリンはFlp-SERT細胞におけるSERTに対して選択的な阻害作用を示し、SERTの機能に問題はないと考えられた。

4. 未規制薬物への適用

未規制薬物であった3F-Phenetrzine (NARD社で合成、医薬品研究科で構造及び純度確認) について新たな試験を適用した。

3F-Phenetrzine (Table. 7, Fig. 5) について、DATに対す

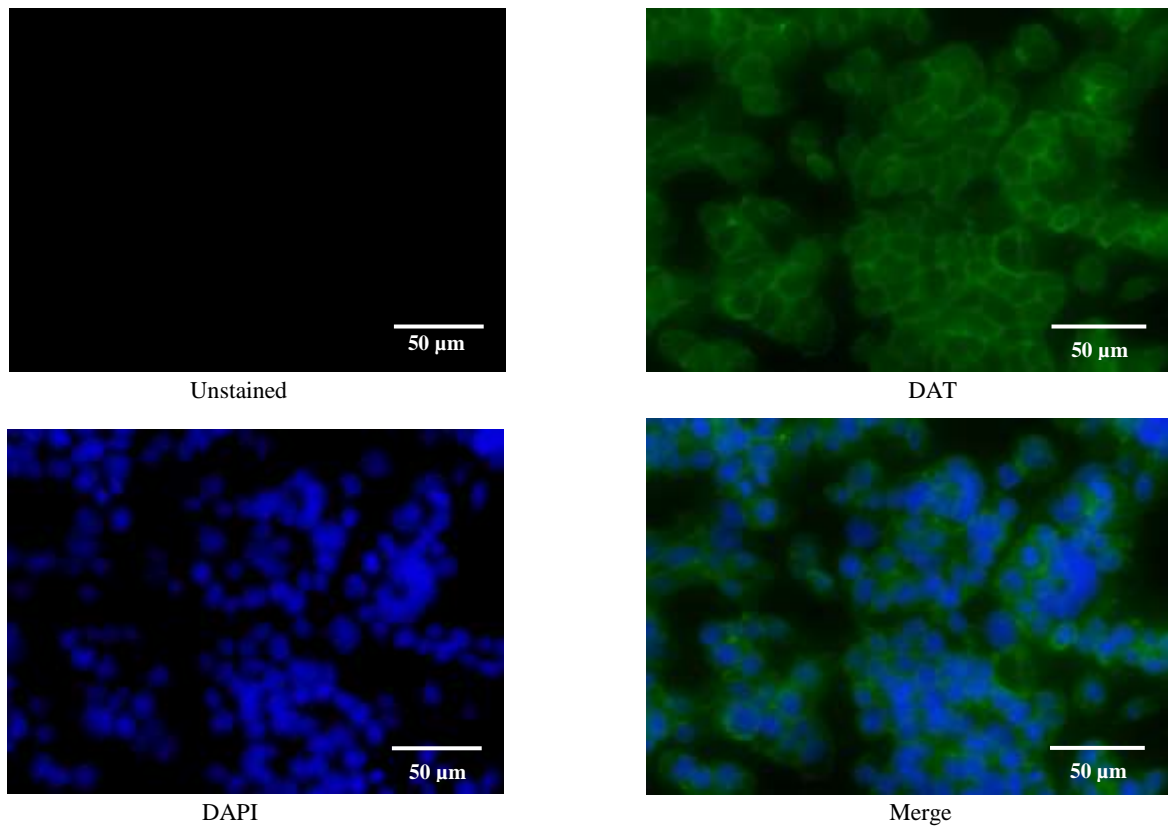


Photo. 6. Immunofluorescent Localization of DAT in Flp-DAT Cells

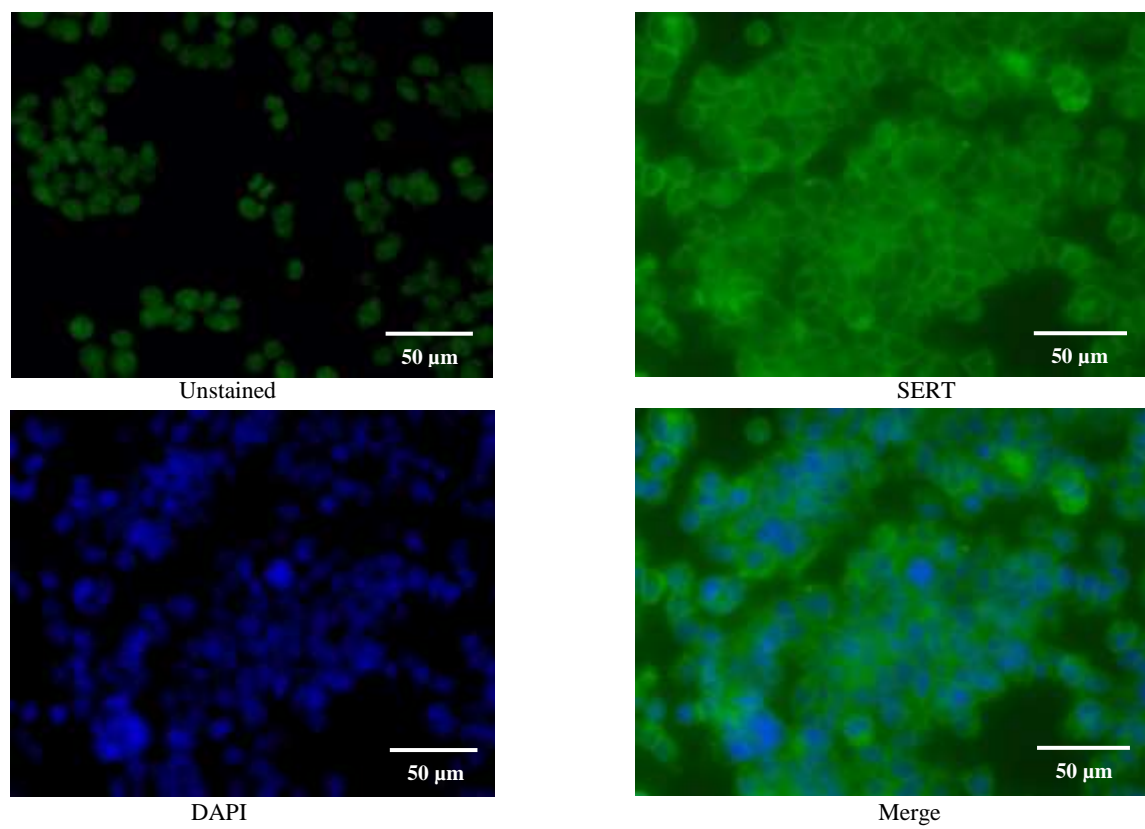


Photo. 7. Immunofluorescent Localization of SERT in Flp-SERT Cells

Table 5. Monoamine Transport Inhibition of GBR12909 in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

Drugs	Flp-DAT Cells (IC ₅₀ , M)	Flp-SERT Cells (IC ₅₀ , M)
GBR12909	8.7×10 ⁻⁸	2.0×10 ⁻⁶
Cocaine (Positive Control)	2.1×10 ⁻⁶	2.1×10 ⁻⁶

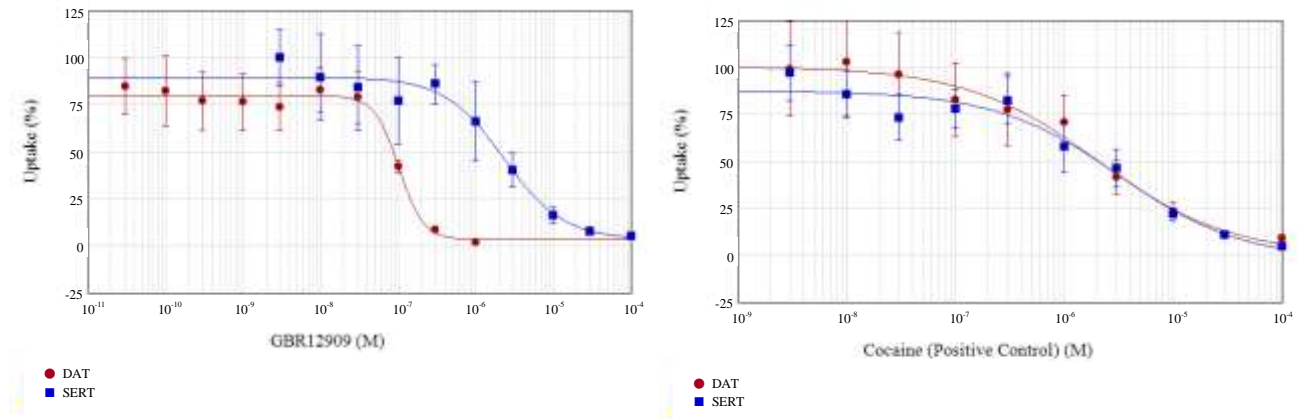


Fig. 3. Dose-Response Curves for GBR12909 and Cocaine in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

Table 6. Monoamine Transport Inhibition of Sertraline in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

Drugs	Flp-DAT Cells (IC ₅₀ , M)	Flp-SERT Cells (IC ₅₀ , M)
Sertraline	3.1×10 ⁻⁷	5.9×10 ⁻⁹
Cocaine (Positive Control)	1.4×10 ⁻⁶	4.9×10 ⁻⁶

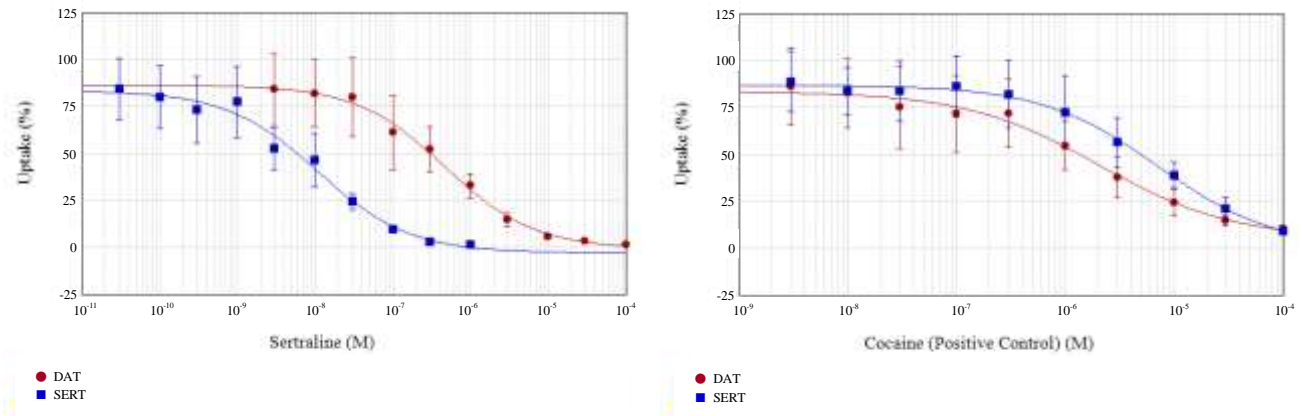


Fig. 4. Dose-Response Curves for Sertraline and Cocaine in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

Table 7. Monoamine Transport Inhibition of 3F-Phenetrzaine in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

Drugs	Flp-DAT Cells (IC ₅₀ , M)	Flp-SERT Cells (IC ₅₀ , M)
3F-Phenetrzaine	8.8×10 ⁻⁶	7.7×10 ⁻⁵
Cocaine (Positive Control)	1.4×10 ⁻⁶	1.5×10 ⁻⁶

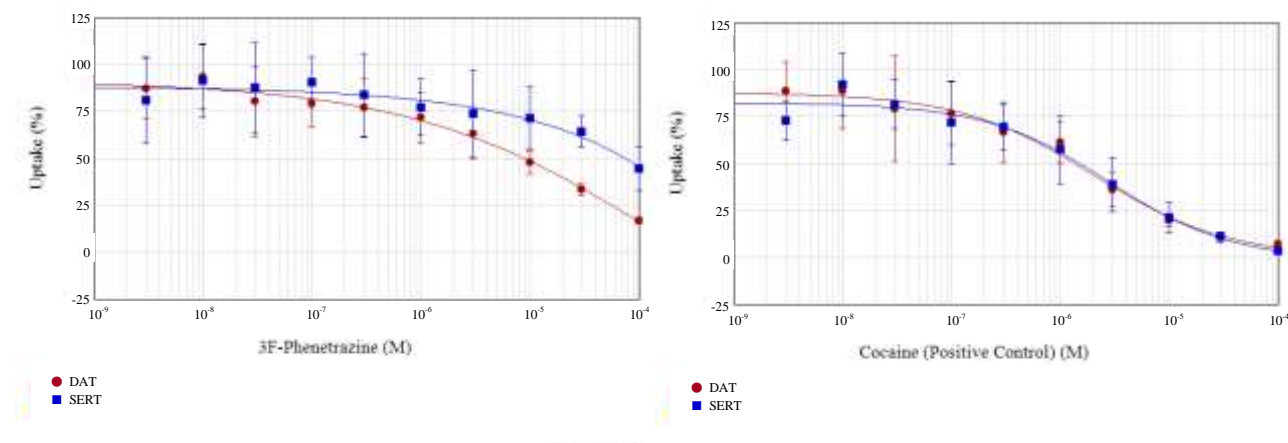


Fig. 5. Dose-Response Curves for 3F-Phenetrizine and Cocaine in Flp-DAT Cells or Flp-SERT Cells

る IC_{50} は 8.8×10^{-6} Mでコカインの IC_{50} の6.3倍であり、コカインよりも弱い阻害が認められた。SERTに対する IC_{50} は 7.7×10^{-5} Mでコカインの IC_{50} の51倍であり、コカインよりも弱い阻害が認められた。得られた結果は他の生体影響試験や構造解析などの結果とともに委員会に諮られ、知事指定薬物に指定された³⁸⁾。

おわりに

合成カンナビノイドの流行は日本だけでなく、欧州や米国等においても報告されており^{39,40)}、深刻な社会現象となっている。

吸入ばく露試験法は、被験薬物をばく露したマウスの行動及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験結果を2種類の陽性対照と比較することにより、観察項目ごとの作用強度及び持続時間の評価を可能にした。委員会には、ヒトカンナビノイド受容体 CB_1 、 CB_2 に対するアゴニスト活性(EC_{50} 値)のデータも合わせて提出し、総合的な評価を行っている。

被験薬物のデータが蓄積していく中で、薬物の構造と CB_1 、 CB_2 の EC_{50} 値及びマウスの行動及び中枢・自律神経症状観察、カタレプシー試験結果との関係を解析し、薬物の構造から薬理作用を推測できるようにすることが、今後の課題である。

また、最近では流行する危険ドラッグの種類が目まぐるしく変化しており、従来の試験法では評価が困難な薬物も出現している。たとえば、サイケデリック(幻覚)系の作用を持つドラッグは、マウスの行動及び中枢・自律神経症状観察での評価が難しい。このため、サイケデリック(幻覚)系作用を評価するための新たな観察項目の設定を検討する予定である。

一方、未規制薬物に対する新たな*in vitro*生体影響試験は、RIの管理が不要となり、ラットの代わりに培養細胞を用いることから動物福祉の面からも有用と考える。ただし、試験から得られる未規制薬物の薬理学的性質については限定

的であり、今後は前述したDAT及びSERTに対する阻害試験と同様の手法でNETに対する阻害試験についても検討していく予定である。

当センターが提供した危険ドラッグの生体影響評価資料は、知事指定薬物の指定に用いられるばかりでなく、国の「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に基づく指定薬物の指定においても活用されている。

今後も新規ドラッグの出現が予想されることから、それらを評価できる新たな試験方法を開発し、危険ドラッグ対策を推進していく。

謝 辞 本研究を実施するにあたり、東京都福祉保健局健康安全部薬務課、当センター薬事環境科学部医薬品研究科、東京都薬物情報評価委員会及び東京都薬物専門調査委員会の皆様に多大な援助と貴重な助言を頂きました。皆様に深謝します。

文 献

- 1) 福森信隆, 安藤 弘, 久保喜一, 他: 東京健安研七周年報, **58**, 293-297, 2007.
- 2) 福森信隆, 安藤 弘, 久保喜一, 他: 東京健安研七周年報, **59**, 329-334, 2008.
- 3) 佐藤かな子, 福森信隆, 野中良一, 他: 東京健安研七周年報, **60**, 21-35, 2009.
- 4) 小縣昭夫, 佐藤かな子, 不破 達, 他: *Yakugaku Zasshi*, **133**(1), 25-29, 2013.
- 5) 不破 達, 福森信隆, 田中豊人, 他: 東京健安研七周年報, **58**, 287-292, 2007.
- 6) Nagai, F., Nonaka, R., Satoh, K., *et al.*: *Eur. J. Pharmacol.*, **559**, 132-137, 2007.
- 7) Nonaka, R., Nagai, F., Satoh K., *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2328-2333, 2007.
- 8) 船田正彦: 危険ドラッグの基礎知識, 2016, 講談社,

東京.

- 9) 田所作太郎 : 薬物と行動, 1-58, 1980, ソフトサイエンス社, 東京.
- 10) Irwin, S. : *Psychopharmacologia(Berl.)* **13**, 222-257, 1968.
- 11) 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.
- 12) 中村敬太, 小沢義人 : 日薬理誌, **78**, 1-8, 1981.
- 13) 佐藤かな子, 野中良一 : *Yakugaku Zasshi*, **128**(12), 1771-1782, 2008.
- 14) Carlson, N. R. : *Physiology of Behavior*, 8th ed., chap. 4, 2004, Pearson Education, Inc.
- 15) 船田正彦, 青尾直也 : 日薬理誌, **130**, 128-133, 2007.
- 16) Nestler, E. J. : *Nat. Genet*, **26**, 277-281, 2000.
- 17) Stolerman, I. : *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**, 170-176, 1992.
- 18) 鈴木 勉 : 日薬理誌, **114**, 365-371, 1999.
- 19) 船田正彦 : 日薬理誌, **126**, 10-16, 2005.
- 20) 山本経之, 藪内健一, 山口 拓, 他 : 日薬理誌, **117**, 49-57, 2001.
- 21) Hoffman, D. C. : *Brain Res. Bull.*, **23**, 373-387, 1989.
- 22) Schechter, M. D. : *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **17**, 21-41, 1993.
- 23) Suzuki, T. : *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **18**, 75-83, 1996.
- 24) Bardo, T. M., *et al.* : *Psychopharmacol.*, **153**, 31-34, 2000.
- 25) Carr, G. D., *et al.* : *The neuropharmacological basis of reward*, 264-319, 1989, Clarendon Press, Oxford.
- 26) Bozarth, M. A. : *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drug*, 241-273, 1987, Springer, Berlin.
- 27) 溝口博之, 野田幸裕, 鍋島俊隆 : 日薬理誌, **126**, 17-23, 2005.
- 28) Colpaert, F. C. : *Drug discrimination Methods of manipulation, measurement, and analysis*, 341-372, 1987, Springer, Berlin.
- 29) 井上堯子 : 乱用薬物の化学, 83-84, 2003, 東京化学同人, 東京.
- 30) 和久敬蔵 : *Yakugaku Zasshi*, **126**, 67-81, 2006.
- 31) 山本郁男 : 北陸大学紀要, **24**, 1-23, 2000.
- 32) 猪又明子, 小縣昭夫, 多田幸恵, 他 : *Yakugaku Zasshi*, **137**(8), 1005-1015, 2017.
- 33) Han, DD., Gu, HH. : *BMC Pharmacol*, **6**, 6, 2006.
- 34) Andersen, PH. : *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 493-504, 1989.
- 35) Koe, BK., Weissman, A., Welch, WM., *et al.* : *J Pharmacol Exp Ther.*, **226**, 686-700, 1983.
- 36) Jørgensen, S., Nielsen, EØ., Peters, D., *et al.* : *J Neurosci Methods.*, **169**, 168-176, 2008.
- 37) Torres, GE., Gainetdinov, RR., Caron, MG. : *Nat Rev Neurosci.*, **4**, 13-25, 2003.
- 38) 知事指定薬物の新規指定について.
<http://www.metro.tokyo.jp/tosei/hodohappyo/press/2017/08/29/07.html> (2017年8月29日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)
- 39) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: European Drug Report 2016: Trends and Developments.
<http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001ENN.pdf> (2016年3月17日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)
- 40) United Nations Office on Drugs and Crime: World Drug Report 2016.
http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf (2016年3月17日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)

【付記】平成30年7月25日付で、「吸入ばく露試験 4. 未規制薬物への適用」に示した知事指定薬物の試験結果例をTHJに変更した。

New Assays to Evaluate the Biological Effects for Illegal Drugs

Akiko INOMATA^a, Yasushi ONO^a, Akio OGATA^b, Yukie TADA^a, Katsuhiro YUZAWA^a, Akemichi NAGASAWA^a, Hiroshi Ando^a, Yoshikazu KUBO^a, Hiroshi TAKAHASHI^b, Fujifumi KAIHOKO^a, Kazuyoshi TANAKA^a, and Noriko HOSHIKAWA^a

In April 2005, the Tokyo Metropolitan Government enacted an ordinance concerning the “abuse prevention of psychoactive drugs”. In response to this ordinance, we devised simple, reproducible assay systems to detect the biological effects of illegal drugs. Here, we describe results of some tests on these new assays, including tests on the neuro-behavior of mice, re-uptake and release of monoamines and G-protein binding in isolated rat brain synaptosomes, and the amount of present neurotransmitters in mouse brains. In addition, we provide results of drug dependence tests such as self-administration, conditional place preference, drug discrimination paradigms. Given the restricted access to laboratory experiments and that current assays are unable to detect new, popular, illegal drugs, our assays fit the growing need to detect the effects of new drugs. Next, we developed a new inhalation exposure method to evaluate the effects of synthetic cannabimimetics. However, owing to the closure of the radioisotope experiment laboratory, we were unable to examine the inhibition of monoamine neurotransmitter re-uptake *in vitro* using rat brain synaptosomes. Therefore, cell lines stably expressing monoamine transporters were prepared to apply a new test, without radioisotopes requiring complicated control and without animals. The validity of this test was investigated. These novel, developed methods are applied to regulate illegal drugs by the Tokyo Metropolitan Government committee responsible for the information on illegal drugs.

Keywords: illegal drugs, inhalation exposure, neuro-behavioral observation, synthetic cannabimimetics, mouse, neurotransmitter monoamines, HEK293 cell, re-uptake inhibition

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out