

危険ドラッグ対策事業における幻覚剤のマウス首振り反応による評価法の導入及び

その評価事例

中村 麻里^a, 河合 礼果^a, 平松 恭子^a, 長澤 明道^a, 篠岡 恭子^a, 野村 紗希子^a, 生嶋 清美^a, 前野 愛^a, 吉田 正雄^b, 山崎 貴子^b, 寺岡 大輔^b, 田中 一絵^b, 市川 瑠子^b, 坂本 美穂^b, 葉 貴寿^c, 遠藤 直幸^{d,e}, 齊藤 祐介^e, 弦間 格^e, 梅沢 誠^{d,f}, 渡辺 大介^e, 牧野 宏章^g, 高橋 秀依^h, 鈴木 俊也^b, 北條 幹^a, 猪又 明子ⁱ

都は平成17年以来、多くの未規制薬物（いわゆる危険ドラッグ）を、その化学構造及び生体影響試験結果による科学的根拠に基づいて規制してきた。当センターでは、生体影響試験として、ICRマウスを用いた行動毒性試験や*in vitro*試験を行ってきたが、幻覚作用を評価する試験系を有していなかった。本稿では、幻覚剤を評価することを目的に、新たに導入したマウス首振り反応（以下HTRと略す）試験について報告する。HTRは、幻覚剤に応答して頭を高速で振るげっ歯類特有の行動であり、目視による計数が困難であるため、当初はマウスのビデオ撮影動画をスロー再生して計数していた。検査の迅速化を目的に、電磁誘導の原理を用いたマグネトメーター法を導入したところ、99%の精度でビデオ法を再現できたが、依然として解析に多大な時間を要した。そこで、簡易フィルタリング法を検討した結果、半自動的な解析が可能になった。この手法では、検出のエラー率はやや高くなったが、解析時間を大幅に短縮できることから、行政検査を迅速かつ正確に実施する上で有効な手法であると考えられた。令和6年度までに15検体の危険ドラッグをHTR試験によって評価し、規制に貢献することができた。また、近年、違法薬物市場で急増しているLSDのプロドラッグ系薬物について比較検討し、1cP-LSD、1V-LSD及び1T-LSDは、LSDと同様に幻覚性を有するが、作用が弱い（累積HTR数が最大となる用量が10倍程度高い）こと等を明らかにした。

キーワード：危険ドラッグ、幻覚剤、首振り反応、HTR、LSD、トリプタミン、フェネチルアミン、プロドラッグ、マグネトメーター

はじめに

都は平成17年4月「東京都薬物の濫用防止に関する条例」を施行して以来、多くの未規制薬物を、知事指定薬物として規制してきた。都や厚労省の規制により、平成27年には、都内の危険ドラッグの販売店舗は撲滅されたが、現在、再び、販売店舗が確認されている。また、インターネットやSNSを主とした販売店も増加しており、賃貸物件の空き部屋を宛先とする、秘匿性の高いメッセージアプリを使用する等、販売方法が巧妙化・潜在化している。これらの薬物乱用をめぐる社会状況を踏まえて、都では、令和6年3月に「東京都薬物乱用対策推進計画」を改定し、危険ドラッグの取締りを一層強化している。

知事指定薬物は、条例に基づいて設置された東京都薬物

情報評価委員会により、国内未規制薬物の化学構造や生体影響を評価検討した上で規制されるもので、当センターでは、委員会の審議に資するデータを提供している。生体影響試験としては、マウスの行動や神経症状を網羅的に評価するIrwinの多元観察法を基にした行動観察試験¹⁾、自発運動量計測及びマイクロダイアリス試験などの動物実験や、モノアミントランスポーター再取り込み阻害試験などの*in vitro*試験を行っている。危険ドラッグは、化学構造によって、合成カンナビノイド、オピオイド、合成カチノン、LSD、トリプタミン、覚醒剤及びフェネチルアミンなどに大別され、種類により興奮や鎮静又は幻覚などの特徴的な精神作用を示す。興奮が主な作用のいわゆるアップ系や鎮静が主な作用のいわゆるダウン系の薬物については、

^a 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
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医薬品研究科
^c 東京都保健医療局健康安全部薬務課
163-8001 東京都新宿区西新宿2-8-1
^d 当時：東京都保健医療局健康安全部薬務課
^e 現所属：東京都保健医療局健康安全部環境保健衛生課
^f 現所属：東京都健康安全研究センター広域監視部薬事監視指導課
^g 武蔵野大学薬学部薬学科
202-8585 東京都西東京市新町1-1-20
^h 東京理科大学薬学部薬学科
125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1
ⁱ 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

これまで上記の試験法により評価が可能であったが、LSD やトリプタミン等の幻覚剤については、既存の手法ではその作用を十分に評価できなかった。

マジックマッシュルーム（シロシピン・シロシン）や LSD などの幻覚剤は5-HT_{2A} 受容体を介して幻覚作用を発現することが報告されているが²⁾、動物実験で幻覚作用を直接評価する方法は存在しない。しかし、幻覚作用を有する5-HT_{2A} 受容体アゴニストは、げっ歯類において「首振り反応（Head-Twitch Response; 以下 HTR と略す）」と呼ばれる非自発的な頭部の高速（120ミリ秒程度）の反復運動を誘発するため^{3,4)}、HTR はヒトにおける幻覚作用の有無を評価する代替的な指標として広く用いられている。そこで、危険ドラッグ対策事業において、東京都健康安全研究センターでは令和元年度から HTR 試験を導入してきた。当初は、幻覚剤を投与したマウスの行動をビデオカメラで撮影し、動画をスロー再生（1/4倍速）して HTR を目視で計数する手法を取っていた。その後、より迅速かつ効率的な手法として、マウスの頭蓋骨表面に磁石を接着し、コイルを巻いた筒の中に収容することで生じる電磁波を検出する電磁誘導の原理を利用したマグネトメーター法へと変更した。このマグネトメーター法には、様々な変法及び解析方法が報告されているほか^{5,6,7)}、使用するマウスの系統によって HTR 応答性が異なることが知られている^{8,9)}。

本稿では、本事業で従来から使用している ICR 系マウスに最適化したマグネトメーター法の試験法の概要と、その結果の一部について報告する。さらに、近年、違法薬物市場で急増している新規 LSD 系プロドラッグの試験結果の詳細についても併せて報告する。

実験方法

1. 実験動物及び飼育条件

Crj:CD1 (ICR) 雄マウス（4 週齢）をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社より入手し、5 週齢に達した発育良好な動物（体重 30～35 g）を試験に供した。動物は、温度 20～26°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（日本クレア株式会社）及び限外ろ過処理水道水を自由に与えた。動物は床敷 ALPHA-dry（Shepherd Specialty Papers 社）入りのプラスチックケージで 1 匹ずつ飼育した。

2. 被験物質

本試験で使用した被験物質の化学構造式をカテゴリーごとに Fig. 1 に示す。

1) LSD 系薬物 (Fig. 1A)

試験に用いた (6*aR*,9*R*)-*N,N*-diethyl-7-methyl-4,6,6*a*,7,8,9-hexahydroindolo-[4,3-*fg*]quinoline-9-carboxamide (LSD), [(2*S*,4*S*)-2,4-dimethylazetidino-1-yl][(8*R*)-6-methyl-9,10-didehydroergolin-8-yl]methanone] (LSZ), (8*R*)-1-(cyclopropanecarbonyl)-*N,N*-diethyl-6-methyl-9,10-

didehydroergoline-8-carboxamide (1*cP*-LSD), (8*R*)-9,10-Didehydro-*N,N*-diethyl-6-methyl-1-pentanoylergoline-8-carboxamide (1*V*-LSD)及び(8*R*)-*N,N*-diethyl-6-methyl-1-(thiophen-2-yl)carbonyl-9,10-didehydroergoline-8-carboxamide (1*T*-LSD) は、いずれも健康安全部薬務課により提供された（東京理科大学で合成）。LSDはKolliphor ELP：生理食塩水溶液（1：3）の混合液を用いて溶解した。LSD以外の被験物質は生理食塩水に溶解した。

2) フェネチルアミン系薬物 (Fig. 1B)

試験には、1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine (DOI), 2-(2,5-dimethoxy-4-methylphenyl)ethan-1-amine (2*C*-D), 1-(3,5-dimethoxy-4-propoxyphenyl)propan-2-amine (3*C*-P)及び2-(2,5-Dimethoxy-4-methylphenyl)-2-methoxyethan-1-amine (BOD)を用いた。DOIはCayman Chemicalから購入し、DOI以外の被験物質は健康安全部薬務課の試用品を当センター医薬品研究科で精製したものを使用した。被験物質は全て生理食塩水に溶解した。

3) トリプタミン系薬物 (Fig. 1C)

試験には、*N*-ethyl-2-(1*H*-indol-3-yl)-*N*-methylethanamine (MET), *N*-methyl-*N*-propyltryptamine (MPT), 3-{2-[Ethyl(propyl)amino]ethyl}-1*H*-indol-4-yl acetate (4-AcO-EPT)及び*N*-ethyl-4-hydroxy-*N*-propyltryptamine (4-HO-EPT)を用いた。MPTは健康安全部薬務課により提供された（株式会社ナード研究所で合成）。MPT以外の被験物質は、健康安全部薬務課の試用品を当センター医薬品研究科で精製したものを使用した。被験物質は全て生理食塩水に溶解した。

3. 首振り反応試験

1) 投与量

投与量は、LSD系は0.1 mg/kg から 10 mg/kg の中から 3～5 用量で設定した。フェネチルアミン系は0.1 mg/kg から 27 mg/kg の中から 3～4 用量で設定した。トリプタミン系は1 mg/kg から 27 mg/kg の中から 3 用量で設定した。対照群には Kolliphor ELP：生理食塩水溶液（1：3）の混合液又は生理食塩水を投与した。

2) 測定・計数方法

(1) **ビデオ法** 被験物質を投与したマウスをピーカーに収容し、30 分間ハイスピードカメラ（1280 × 720 画素、120 フレーム/秒）で真上から撮影した（各群 3 匹）。その動画を 1/4 倍速に変換し、目視により HTR 数を計数した。

(2) **マグネトメーター法 (A 法)** Halberstadt らの報告¹⁰⁾に基づく半自動 HTR 検出システムを構築した（BRC バイオリサーチセンター株式会社）。本システムは、6組のコイル筒と 3 L のツールピーカー、AD コンバーター（Powerlab 4/26）、解析用 PC、タイマー及びビデオカメラの 6 つから構成される（Fig. 2A）。コイル筒は直径 15.5 cm、高さ 28 cm の透明アクリル製で、底面から 1.5 cm の部位から幅 6 cm のコイル（径 0.3 mm のニッケルクロム合金ワイヤー 200 巻）が取り付けられている。コイルは、データ取

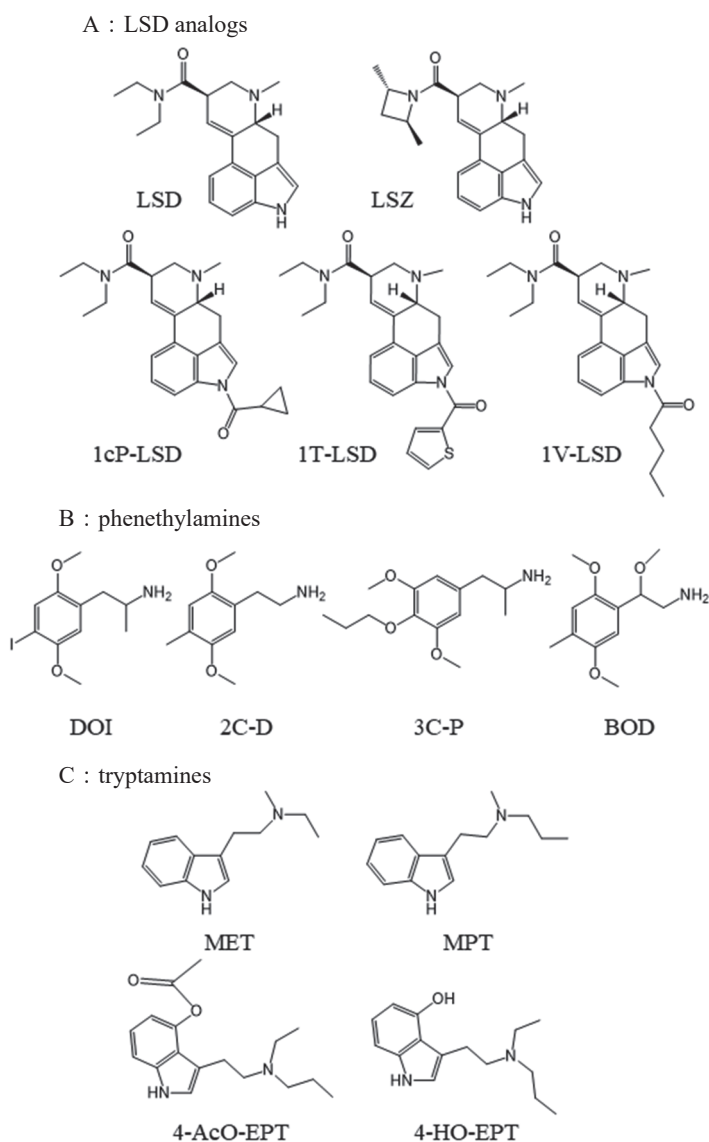


Fig. 1. Chemical structures of hallucinogens used in this study

録システムである AD コンバーターに接続し, AD コンバーターは解析ソフト LabChart ver.8 を搭載した PC へと接続されている. 三種混合麻酔薬 (メドトミジン 0.3 mg/kg/ミダゾラム 4 mg/kg/ブトルファンール 5 mg/kg) による麻酔下でマウスの頭皮を体軸方向に切開し, 頭蓋の背側中央にネオジウム磁石 (4 × 4 × 2 mm) を接着剤及び歯科用セメントを用いて固定した (Fig. 2B, 2C). 予備試験により, 術後 2 日間回復させた個体と 7 日間回復させた個体では, 後者の個体の方が非投与において HTR 数が少なくなることが確認され (Fig. 2D), 術後回復期間を長くすることでベースラインの HTR 数の上昇を防止できることが分かった. 一方で, 回復期間が長すぎると磁石が脱落する恐れがあるため, 本研究では, 回復期間を 1~2 週間に設定した. マウスは, 投与直前に 30 分間ビーカー内に入れ, 馴化した.

ビーカーをコイル筒の内側に入れ, 被験物質を投与した動物をビーカーに収容し 30 分間の測定を行った (各群 6 匹: 最大 6 匹まで同時に測定可能) (Fig. 2E). ハイスピードカメラで真上から撮影した映像と, 波形データの時間を

同期させるためにタイマーを設置した. なお, 動物の視覚的な影響を最小限にするため, コイル筒の側面は灰色の画用紙で覆った.

コイルからのアナログ信号は, ローパスフィルター (アンチエイリアシングフィルター) を用いてサンプリングし (サンプリングレート 4 kHz), AD コンバーターによりデジタル化した. 取得した波形データは, 周波数 40~200 Hz のバンドパスフィルターと振幅 0.1 mV 以上の条件でフィルタリングを行った (一次スクリーニング). ここで得られた候補波形は, 正弦波状, 2つ以上の双極性ピーク, 120 ミリ秒未満の持続時間及び直前と直後の安定した電圧の 4 つの基準¹⁰⁾に従い, 目視で評価するが, ノイズや他の交絡因子により評価が難しい波形は, さらに動画での確認を行った (二次スクリーニング). このように, 自動フィルタリング後に波形と動画を合わせた確認を行う二段階のスクリーニングを行う解析方法を A 法とした.

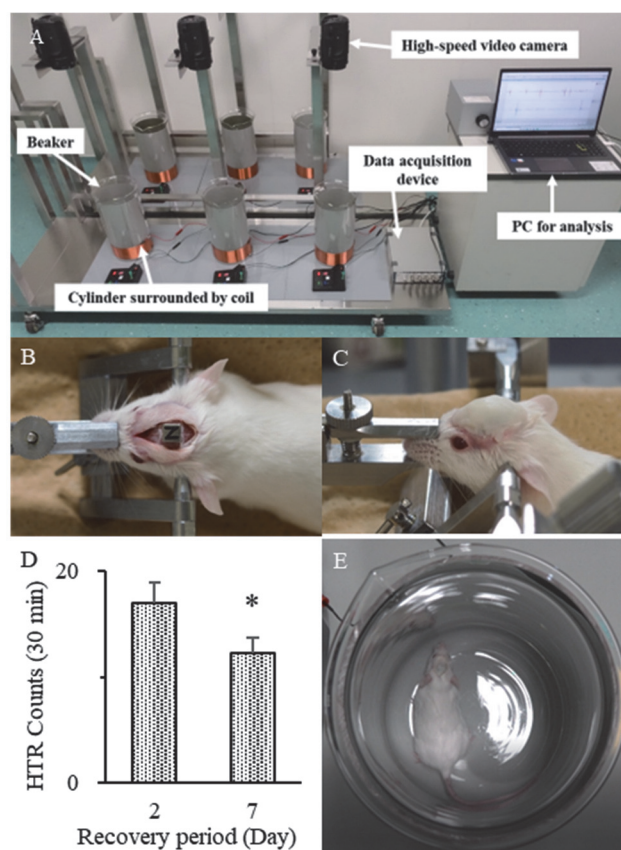


Fig. 2. System for detecting HTRs in mice using a magnetometer.

(A) Appearance of the magnetometer consisting of six beakers, six acrylic cylinders, six video cameras, a data acquisition device (AC converter) and a laptop PC. (B) Small neodymium magnet is attached to the central region of the scalp (dorsal view). (C) Mouse head covered with dental cement (side view). (D) Comparison of HTR counts between 2 recovery periods (2 and 7 days) following the surgery without any administration of agents. Data are expressed as mean ± S.E. * $p < 0.05$, paired t-test. (E) Mouse in the beaker during an experiment.

(3) 簡易フィルタリング法 (B法) A法と同様に取得した波形データについて、フィルタリングを、周波数70~200 Hzのバンドパスフィルター及び振幅0.15 mV以上に設定して自動フィルタリングのみを行った。これをB法とした。

4. 統計解析

術後回復期間の違いによる同一個体の HTR 数の差異の検定には対応のある t 検定を用いた。その他の HTR 数の多群間の差異の検定には全て Steel 検定を用いた。また、異なる手法による HTR 検出数の相関関係はピアソンの相関係数により評価した。全ての解析は Excel 統計 ver.7 (株式会社エスミ) を用いて実施し、有意差水準は 5%とした ($p < 0.05$)。

5. 動物実験の取り扱い

本研究で実施した動物実験は、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。動物飼育と動物実験は、関連法令及びARRIVEガイドラインに基づく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。

結 果

1. 幻覚剤によるHTRの誘発

HTR試験の導入検討にあたり、HTR試験の陽性対照物質として広く使用される5-HT_{2A}受容体アゴニストであるフェネチルアミン系薬物のDOIを投与した。ビデオ法により30分間のHTR数を計数し、DOI投与によるマウスHTRの、既報との再現性を確認した(Fig. 3A)。また、平成27年度に知事指定薬物となった2C-Dについても、同様に測定したデータをFig. 3Bに示す。投与量は知事指定の諮問時の行動試験に合わせ、いずれも0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 11 mg/kg及び27.5 mg/kg (各群3匹)とした。5分ごとの観察では、両薬物の投与群において投与後5~10分にHTR数のピークを迎え、30分までに減少する傾向が観察された。また、30分間の累積HTR数は、両薬物とも11 mg/kg用量群で最大となり、27.5 mg/kg用量群では11 mg/kg用量群と比べて減少した。これらの経時変化と用量反応性は、既報と類似しており、我々のビデオ法が正しくHTR試験を評価できることが確認できた。一般的に、HTRの用量反応曲線は、逆U字型になることが知られており¹¹⁾、これは用量が増加すると、薬物が5-HT_{1A}受容体や5-HT_{2c}受容体などのHTR数の抑制に働く受容体に作用するためと考えられている^{12,13)}。

2. マグネトメーター法 (A法) の検出精度

マグネトメーター法による HTR の検出精度を検証するため、陽性対照物質として、DOI と LSD を用いて、従来法であるビデオ法との比較を行った。マグネトメーター法 (A法) ではビデオ撮影を同時に実施しているため、同一のデータセットについて、マグネトメーター法と、ビデオ

法のそれぞれで解析し、比較することが可能である。どちらの幻覚剤も用量依存的に HTR 数が増加する範囲で 3 用量群を設定した (Fig. 4A)。

これらの取得データのうち、対照群を含む 4 群について (各群 N=6)、投与後 10 分間の HTR を両手法で評価したところ、DOI と LSD のいずれにおいても、両手法で得られた HTR 数には高い正の相関が認められた (それぞれ Pearson $r = 0.99982$ 及び $r = 0.99980$) (N=24) (Fig. 4B)。マグネトメーター法による DOI 及び LSD の HTR 総検出率は、それぞれ 98.6%及び 98.5% (マグネトメーター法での HTR 数/ビデオ法での HTR 数 : 929/942 及び 512/520) であった。マグネトメーター法で検出されなかった 1.4%及び 1.5%は、振幅が極めて小さかったためと考えられた。

3. マグネトメーター法 (B法) の検出精度

A法は、ビデオ法と同等の高い精度でHTRの評価が可能であったが、周波数及び振幅による一次スクリーニングでは、多数の偽陽性シグナルが検出されるため、動画解析を含む二次スクリーニングに多大な時間を要するという課題があった (Fig. 5)。今回、解析時間の短縮と高精度の両立を目的として、フィルタリング条件を検討したところ、A法の一次スクリーニングよりも厳しい (狭い) 条件である周波数70~200 Hzのバンドパスフィルター及び振幅0.15 mV以上という組み合わせが良好であり (B法)、二次スクリーニング工程を省略できることが分かった (Fig. 5)。そこで、B法の有効性を評価するために、陽性対照物質や知事指定物質を含む8種類の薬物について、A法によって評価された合計16,582回のHTRを対象に、B法による再評価を実施した (Table 1)。8つの薬物の比較結果から、B法では、偽陽性と偽陰性に基づく検出の平均エラー率は 11.20% (5.78~15.93%) であり、全体の傾向として、エラーは偽陰性側に偏ることが確認された。また、薬物の種類や投与量に起因するエラー率の増減は認められなかった。多くの場合、偽陰性となったシグナルは低い振幅のためであり、これは、HTR中にマウスが鼻を上げたときに検出されやすいものであることが分かった。

4. 令和元年度~令和6年度に実施した幻覚剤のHTR試験結果の概要

令和元年度~令和6年度に実施した15被験物質のうち、一部の結果を Table 2 にまとめた。幻覚剤は LSD 系、フェネチルアミン系、トリプタミン系の3つのカテゴリーに分類した。HTR試験を導入した当初はフェネチルアミン系薬物が多くを占めていたが、近年では LSD 系及びトリプタミン系薬物の試験数が増加している。各試験では、原則として3用量群を設定しており、必ずしも逆U字の用量反応曲線を得られてはいないが、HTR数が最も多かった用量を「ピーク用量」として記載した (Table 2)。

ピーク用量は、おおむね、LSD系<トリプタミン系<フェネチルアミン系の順に低かった。30分間の累積HTR

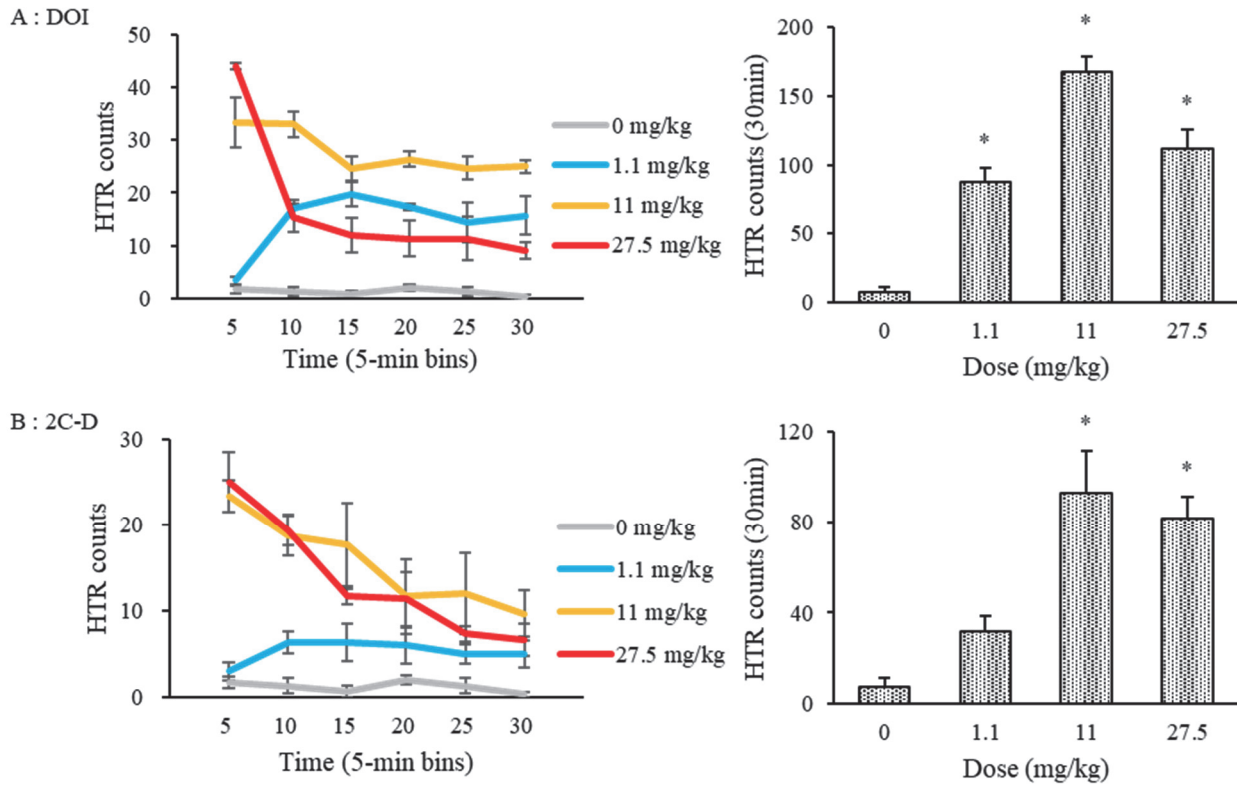


Fig. 3. Dose-dependent effects of DOI (A) and 2C-D (B) on the HTR (Video method).

(left) Time-course of the HTRs induced by DOI and 2C-D in 5-min time blocks ($N = 3/\text{group}$). Data are shown as group means \pm S.E. (right) Total HTR counts of DOI and 2C-D recorded over the 30-min time period using the high-speed camera ($N = 3/\text{group}$). Data are expressed as mean \pm S.E. * $p < 0.05$, Steel test.

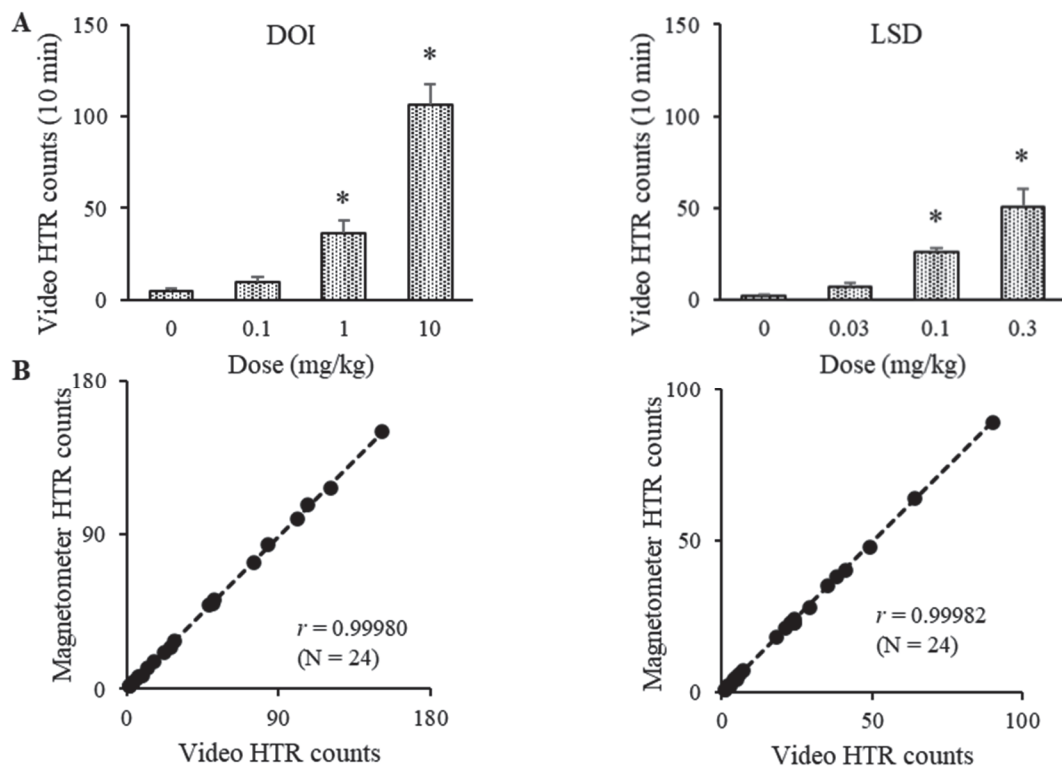


Fig. 4. Comparison of the HTR counts detected by the magnetometer recording and video scoring.

(A) HTR counts per 10 minutes assessed by video scoring in four dose-dependent groups for DOI (left) and LSD (right) ($N = 6/\text{group}$). Data are expressed as mean \pm S.E. * $p < 0.05$. (B) Correlation between HTR counts obtained from magnetometer recordings (Method A) and video scoring ($N = 24$). Pearson r values and significance ($p < 0.05$) are indicated.

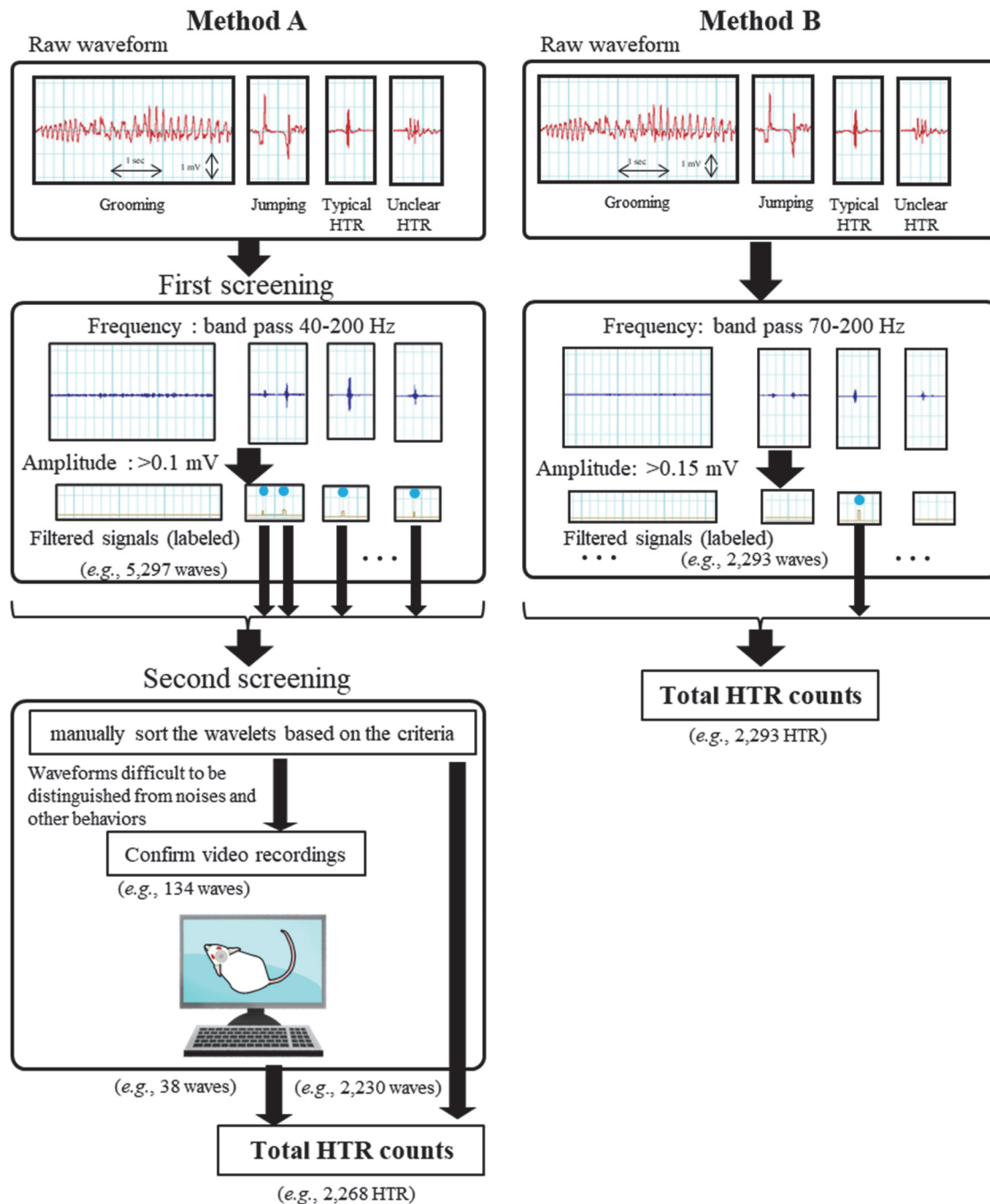


Fig. 5. Flowchart of the magnetometer signal analysis conducted in this study. Examples of signal counts at each analysis step are shown in parentheses (LSD experiment; data from 42 mice across seven groups). In Method A (left), raw data filtered in two phases (representative waveforms are shown on the top). HTR candidates are identified through automated screening using a band-pass filter and amplitude cutoff (shown as blue circles), and then their waveforms are manually verified against the criteria (see main text), followed by video-based validation if necessary. Many false-positive signals are collected in the first screening. In Method B (right), raw data are filtered only by a band-pass filter and a cutoff amplitude. The labeled signals (blue circles) are then counted directly. Not only grooming and jumping behaviors, but also unclear HTRs with low frequency and amplitude can be excluded.

数は、いずれの薬物においても対照群と比較して有意に増加したが、薬物ごとにその絶対数は異なっており、カテゴリーごとの特徴は認められなかった。トリプタミン系薬物のHTR数は、MET及びMPTでは20回前後であったが、4-AcO-EPT及び4-HO-EPTではその10倍程度の回数とな

った。

5. LSD系薬物のHTRの経時変化と用量反応性

近年、幻覚剤の中でもエルゴリン骨格を有するLSD系薬物、特にN1基が置換されているプロドラッグと思われ

Table 1. Analysis of Method B's performance in detecting HTR

Drug	Method A HTR counts	Method B HTR counts	False positive detections	False negative detections	Total errors ^a	Total error rate (%) ^b
LSD	2,268	2,293	134	109	243	10.71
LSZ	1,341	1,348	98	91	189	14.09
1cP-LSD	854	834	58	78	136	15.93
1V-LSD	1,488	1,468	33	53	86	5.78
DOI	4,352	3,861	59	550	609	13.99
2C-D	2,545	2,338	3	210	213	8.37
MET	411	380	5	36	41	9.98
4-Aco-EPT	3,323	3,042	30	311	341	10.26
Total	16,582	15,564	420	1,438	1,858	11.20

^aTotal errors = [number of false positive detections] + [number of false negative detections]

^bTotal error rate = [total errors] ÷ [Method A HTR counts] × 100

Table 2. HTR data of hallucinogenic new psychoactive drugs ("Kiken drugs") and reference compounds

	Drug	Peak dose (mg/kg)	Counts/30 min at peak dose (mean ± SE)	N	Method	Regulation fiscal year
LSD analogs	LSD	0.3	107.3 ± 17	6	A	-
	LSZ	0.33	89.5 ± 12	6	A	2022
	1cP-LSD	3	42.0 ± 5.0	6	A	2020
	1V-LSD	3.3	107.2 ± 13	6	A	2022
	1T-LSD	≧ 3	79.0 ± 10	6	A	2024
phenethylamines	DOI	10	287.8 ± 29	6	A	-
	2C-D	11	93.0 ± 19	3	Video	2015
	3C-P	11	61.3 ± 8.4	3	Video	2017
	BOD	11	52.3 ± 7.5	3	Video	2020
tryptamines	MET	3	26.8 ± 4.2	6	A	2022
	MPT	9	16.5 ± 2.9	6	B	2024
	4-Aco-EPT	9	210.7 ± 34	6	A	2020
	4-HO-EPT	3	128.3 ± 20	6	A	2023

All HTR tests were performed from 2019 to 2024 irrespective of the regulation years of each drug.

る検体の検査が増加している。これらの被験物質について、投与後のHTR数の経時変化及び30分間の累積HTR数を、陽性対照物質であるLSDと共に示した (Fig. 7)。ほとんどのLSD系薬物において、HTR数は投与後5~15分間に増加し、その後減少する傾向が認められた。ただし、1cP-LSDに関しては他の薬物と比較してピークの出現がやや遅延した。また、LSD系薬物のうち1T-LSDを除くすべての被験物質において、30分間の累積HTR数は逆U字の用量反応曲線を示した。

考 察

1. HTR試験におけるマグネトメーター法の実用性

HTRはヒトには見られないげっ歯類特有の行動であり、本稿で述べたHTR試験を導入することで、都の薬物情報

評価委員会において幻覚作用の有無を評価項目として加えることが可能となった。本研究で構築したマグネトメーター法は、DOI及びLSDを用いた検証において、ビデオ法との一致率はそれぞれ98.6%及び98.5%であり、Halberstadtらが報告¹⁰⁾した一致率とほぼ同等の精度を示した。さらに、B法を導入することで、HTRの半自動検出が可能になった。近年、ニューラルネットワークを用いたマグネトメーターの波形の自動検出法⁵⁾や、マウスの跳躍による偽陽性を除去するための手法⁶⁾、AIにより動画からHTRを計数する方法⁷⁾など、様々な新手法が提案されているが、これらは高価なソフトウェアや高度なAI技術、電気生理学などの専門的な知識を必要とするため、導入と確証実験には障壁がある。一方、本研究のB法は、バンドパスフィルターと振幅の閾値の変更のみでノイズを大幅に除去することを可能

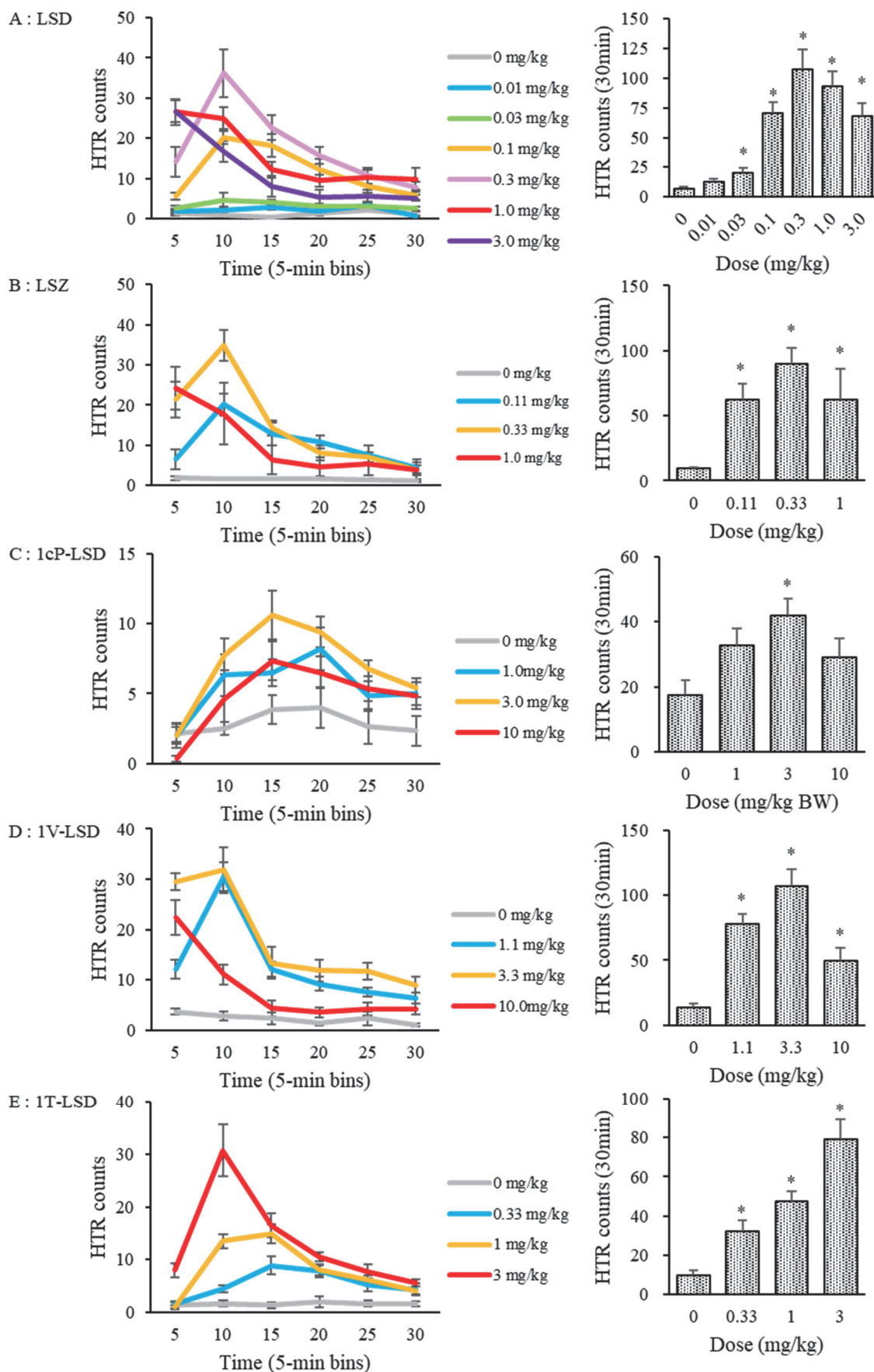


Fig. 7. HTR data of LSD analogs. Time-course (left) and total counts (right) of HTRs induced by (A) LSD, (B) LSZ, (C) 1cP-LSD, (D) 1V-LSD and (E) 1T-LSD (N = 6/group). Data are shown as group means ± S.E *p < 0.05, Steel test.

Table 3. Comparison of the peak doses and counts of HTR tests for LSD analogs between ICR and C57BL/6 mice

Drug	Peak dose (mg/kg)	Counts /30 min at peak dose (mean)	Previously published HTR data using C57BL/6J ^{10,16,17,18,19)}		
			Peak dose (mg/kg)	Counts /30 min at peak dose (mean)	ED ₅₀ (μg/kg)
LSD	0.3	107.3	0.2	82	52.9
LSZ	0.33	89.5	0.2	33	52
1cP-LSD	3	42.0	1	32	204.6
1V-LSD	3.3	107.2	1	66	181
1T-LSD	≧3	79.0	3	49	780.4

にした。また、解析条件がシンプルであるため、誰でも容易に解析を行うことができるという利点がある。ただし、低振幅及び低周波数の波形を認識できず、また、跳躍やグルーミングなどの偽陽性を完全に除外することはできなかった。Halberstadtらも、周波数と振幅に基づく単純なスクリーニングでは、100%の検出率を達成することは困難であると報告している⁹⁾。そのため、B法で検出率が落ちることは想定していたが、動物の週齢や手術、回復期間、測定実施の時間帯等の細かな条件を一定にできたため、エラー率を平均11.20%まで抑えることができたと考えられる。さらに、多くの薬物でエラーは偽陰性側に偏ったが、これは、B法では周波数帯域を狭め、振幅の閾値を高く設定したこと起因する妥当な結果であると考えられる。B法は、A法やビデオ法に比べて解析に要する手間や時間を大幅に削減できる点から、一定のエラー率を許容範囲とすることにより、行政検査における迅速性と正確性のバランスが取れた評価手法であると結論した。近年、幻覚系の未規制薬物の諮問件数は増加傾向にあり、令和元年度には年間1件であったが、令和6年度には5件に達しており、これは、HTR試験を従来のビデオ法からマグネトメーター法、特にB法へ切り替えることにより実現できたものであった。

2. HTR の作用強度の比較

HTR の作用強度は通常、用量反応曲線から算出される50%有効量 (Efficacy Dose; ED₅₀) により評価されるが、本研究では用量設定が3群に限られていたため、ED₅₀の算出は困難であった。そこで、各薬物において累積 HTR 数が最大となった用量 (ピーク用量) をもとに、薬物間の相対的な作用の強さを比較した。Table 2 に示すように、ピーク用量は LSD 系<トリプタミン系<フェネチルアミン系の順に低値を示し、これは既報の HTR の ED₅₀ から推測できる作用の強さとおおむね一致していた。

また、最大の累積 HTR 数と5-HT_{2A} 受容体への活性の強さの間に相関があるとする報告がある¹⁴⁾。すなわち、ある薬物が5-HT_{2A} 受容体に対して高い活性を示す場合、累積 HTR 数が多くなるというものである。しかし、本研究では、LSD や LSZ のようにピーク用量が低く (活性が高い)、かつピーク用量の累積 HTR 数も多い薬物がある一方で、MET のようにピーク用量が比較的低いにもかかわらず、

累積 HTR 数が少ない薬物もあり、両者の間に関係性は認められなかった (Table 2)。しかしながら、トリプタミン系薬物の4つの被験物質に関しては、同程度のピーク用量であったにもかかわらず、累積 HTR 数では10倍程度の差が生じるという興味深い結果が得られた。4位及び5位に置換基を有する *N,N*-ジアルキルトリプタミンは、DMT や DET, DPT のように置換基を持たないトリプタミンと比べて、5-HT_{2A} 受容体に対する親和性及び効力が高いとされている¹⁵⁾。今回の結果は、MET と MPT は、4位と5位の両方に置換基を持たないため、4-AcO-EPT と4-HO-EPT よりも累積 HTR 数が少なくなった可能性がある。

さらに、*in vitro* における5-HT_{2A} 受容体への結合親和性に関しては、LSD 系>フェネチルアミン系>トリプタミン系の順に高いとする報告もあり^{11,15)}、本研究で得られた HTR のピーク用量による作用強度とは異なる傾向を示した。この要因としては、結合親和性が同一カテゴリー内でも薬物ごとに大きく異なることに加え¹⁵⁾、HTR が5-HT_{2A} 受容体への親和性だけでなく、脳内における受容体密度や5-HT_{1A} や5-HT_{2C} 受容体への結合など^{12,13)}、複数の要因が HTR の誘発に関与していることが示唆される。

3. マウス系統による HTR の感受性の違い

HTR は、動物種間及び系統間で感受性に差があることが知られている。種間比較では、マウスはラットよりも多くの HTR を示す傾向があり、マウスの系統間、さらには亜系統間でも感受性に違いがあることも報告されている⁹⁾。例えば、DBA/2J マウスはC57BL/6J マウスと比べて DOI 投与後の HTR 感受性が高く (ピーク用量や ED₅₀が低い)、累積 HTR 数は多いことが報告されている⁸⁾。また、同じ C57BL/6系統であっても、C57BL/6N マウスと C57BL/6J マウスとでは HTR 反応に大きな差がある⁹⁾。さらに、Albino Swiss や NMRI マウスでは HTR 感受性が低いことが示されており⁹⁾、系統による違いは顕著である。HTR の系統間の違いに関するメカニズムは未だ明らかにされていないが、脳内の5-HT_{2A} 受容体密度が関与している可能性がある⁹⁾。

本研究では、既報の HTR 試験において使用例の少ない ICR マウスを用いた。ICR マウスはクローズドコロニーの系統の一つとして、安価で入手が容易であるため、製薬及び毒性学分野で広く使用されているが、薬理学研究においては近交系の C57BL/6系の使用が大多数を占め、ICR の

HTR 試験への活用は進んでいない。LSD 系薬物に関する既報と本研究の ICR マウスの結果を比較したところ (Table 3), 全体として, ICR ではピーク用量がやや高く, ED₅₀値も高くなると想定されるため, ICR マウスの HTR 感受性は C57BL/6J より低いことが示唆された。LSD については, 十分な数の投与用量群を設定したため, 我々も既報で HTR の ED₅₀を算出しており (86 µg/kg), C57BL/6J (Table 3, 52.9 µg/kg) よりも高値となることを確認済である²⁰⁾。一方で, 薬物間の相対的な作用強度の傾向は両系統で一貫しており, ICR マウスにおいても作用強度の差異の検出が可能であることが分かった。また, 1T-LSD の ED₅₀は 780.4 µg/kg と報告されており¹⁹⁾, 本研究で示した LSD 系薬物の中で, 最も ED₅₀が高く, そのため活性が弱いと推測される。今回, 1T-LSD のピーク用量は 3 mg/kg を超えていた可能性があるため, LSD, LSZ > 1cP-LSD, 1V-LSD > 1T-LSD の順に作用が強いと推測される。

本研究は, ICR マウスにマグネトメーター法が適用可能であることを示す基礎的知見を提供すると共に, 多数の幻覚剤における ICR マウスの HTR データを提示することで, 今後のマウス系統差に関する研究の進展に貢献するものである。

4. LSD 及びそのプロドラッグの HTR 誘発性

本研究で扱った LSD 系薬物のうち, N1位に置換基を有する 1cP-LSD, 1V-LSD 及び 1T-LSD は, 既報の文献から, 化合物そのものに活性は無く, 摂取後に体内で LSD に代謝されて作用するプロドラッグであると推測されていた。例えば, ヒト肝臓 S9 分画を用いた *in vitro* 試験により, 4種の N1置換基を有する LSD 系危険ドラッグが主に CYP1A2 と CYP3A4 によって LSD に代謝されることが示されている²¹⁾。また, 受容体結合アッセイやマウス HTR 試験及びラット血中濃度測定から, 1P-LSD 及び ALD-52 に関して, LSD のモル濃度に基づく効力の約 15~50% の HTR を誘発することや, 血漿中から LSD に加えて親化合物及び複数の代謝物が検出されることが報告された²²⁾。実際, 1cP-LSD, 1V-LSD 及び 1T-LSD についても, 5-HT_{2A} 受容体結合アッセイでは陰性であったが, 腹腔内投与後のマウス血中から LSD が検出され (データ未掲載, 令和 6 年度東京都薬物情報評価委員会における報告), HTR も誘発されたため, プロドラッグであることが強く示唆された。また, LSD や LSZ と比較してピーク用量が約 10 倍高く, 作用が弱い傾向が認められた。血中濃度の定量的な解析は未実施であるが, 既報と同じく LSD だけでなく未代謝物も高い比率で検出されていた。プロドラッグを投与したマウスにおいては, LSD を投与した場合と比較して LSD の血中濃度が低く, HTR 誘発の作用が弱くなった可能性がある。

これら 3 種の薬物の HTR 数の経時変化のパターンは, おおむね LSD のものと類似することが分かった。C57BL/6 マウスを用いた既報の実験結果とも一致しており, HTR 数のピークは LSD と同様に投与後 5~10 分に認められ, 速や

かに代謝されることが示唆された。ただし, 1cP-LSD については, Brandt らの報告¹⁷⁾と同様に, ピークが後方 (10~15 分) にシフトしていた。ヒト血清中でのインキュベーション実験において, 1cP-LSD は 1P-LSD と比較して LSD への加水分解が起こりにくいという報告があるため¹⁷⁾, 代謝の遅れが HTR 反応のピーク時間に反映されていることが示唆された。

おわりに

これまで, 当センターでは危険ドラッグの生体影響試験を実施し, 東京都薬物情報評価委員会が知事指定薬物として指定を行う際の科学的根拠を提示してきた。本稿で述べたように, 令和元年度からマウス HTR 試験を新たに導入し, 従来の試験では検出されなかった幻覚作用が評価可能となった。導入当初は, 解析に時間を要していたが, マグネトメーター法の導入と簡易フィルタリングの設定により行政検査の効率化を実現し, 迅速かつ正確な評価法であるといえる。近年, 幻覚作用を持つ LSD 系の未規制薬物は世界的に増加傾向にあり, 特に, 本邦では令和 4 年の 1T-LSD を摂取した危険ドラッグ使用者がマンションから飛び降りるという事件が発生して以来, 重要な規制対象となっている。今後も, LSD 系に限らずフェネチルアミン系やトリプタミン系の幻覚剤も含めてマグネトメーター法を活用した試験の遂行により, 速やかな規制の実現に貢献していく。

文 献

- 1) Irwin, S.: *Psychopharmacologia(Berl.)*, **13**, 222–257, 1968.
- 2) Nichols, D.E.: *Pharmacol. Ther.*, **101**, 131–181, 2004.
- 3) González-Maeso, J., Weisstaub, N.V., Zhou, M., *et al.*: *Neuron*, **53**, 439–452, 2007.
- 4) Halberstadt, A.L.: *Behav Brain Res*, **277**, 99–120, 2015.
- 5) Halberstadt, A.L.: *Sci. Rep.*, **10**, 8344, 2020.
- 6) de la Fuente Revenga, M., Shin, J. M., Vohra, H. Z., *et al.*: *Scientific Reports*, **9**, 14247, 2019.
- 7) Maitland, A.D., Gonzalez, N.R., Walther, D., *et al.*: *bioRxiv preprint*, 2025.
- 8) Canal, C.E., Olaghere da Silva, U.B., Gresch, P.J., *et al.*: *Psychopharmacology*, **209**, 163–174, 2010.
- 9) Canal, C.E., Morgan, D.: *Drug Test. Anal.*, **4**, 556–576, 2012.
- 10) Halberstadt, A.L., Geyer, M.A.: *Psychopharmacology*, **227**, 727–739, 2013.
- 11) Fantegrossi, W.E., Murnane, K.S., Reissig, C.J.: *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 17–33, 2008.
- 12) Shahar, O., Botvinnik, A., Esh-Zuntz, N., *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14148, 2022.
- 13) Fantegrossi, W.E., Simoneau, J., Cohen, M.S., *et al.*: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **335**, 728–734, 2010.
- 14) Vickers, S.P., Easton, N., Malcolm, C.S., *et al.*: *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **69**, 643–652, 2001.

- 15) Kozell, L.B., Eshleman, A.J., Swanson, T.L., *et al.*: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **385**, 62–75, 2023.
- 16) Brandt, S.D., Kavanagh, P.V., Westphal, F., *et al.*: *Drug Test. Anal.*, **9**, 38–50, 2016.
- 17) Brandt, S.D., Kavanagh, P.V., Westphal, F., *et al.*: *Drug Test. Anal.*, **12**, 812–826, 2020.
- 18) Brandt, S.D., Kavanagh, P.V., Westphal, F., *et al.*: *Drug Test. Anal.*, **13**, 1–8, 2021.
- 19) Brandt, S.D., Kavanagh, P.V., Gare, S., *et al.*: *Drug Test. Anal.*, **16**, 482–488, 2024.
- 20) Nakamura, M., Hojo, M., Kawai, A., *et al.*: *Fundam. Toxicol. Sci.*, **10**, 189–197, 2023.
- 21) Wagmann, L., Richter, L.H.J., Kehl, T., *et al.*: *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4751–4763, 2019.
- 22) Halberstadt, A.L., Chatha, M., Klein, A.K., *et al.*: *Neuropharmacology*, **172**, 107856, 2020.

Application of the Murine Head-Twitch Response Assay to the Regulation of Hallucinogens Circulating in Illegal Drug Markets: Methods and Examples

Mari NAKAMURA^a, Ayaka KAWAI^a, Kyoko HIRAMATSU^a, Akemichi NAGASAWA^a, Kyoko HATAOKA^a, Sakiko NOMURA, Kiyomi IKUSHIMA^a, Ai MAENO^a, Masao YOSHIDA^a, Takako YAMAZAKI^a, Daisuke TERAOKA^a, Kazue TANAKA^a, Yoko ICHIKAWA-KAJI^a, Miho SAKAMOTO^a, Takatoshi YOH^b, Naoyuki ENDO^b, Yuusuke SAITO^b, Itaru GENMA^b, Makoto UMEZAWA^{a,c}, Daisuke WATANABE^b, Kosho MAKINO^d, Hideyo TAKAHASHI^e, Toshinari SUZUKI^a, Motoki HOJO^a, and Akiko INOMATA^a

Since 2005, the Tokyo Metropolitan Government has regulated numerous novel psychoactive substances (NPS), also known as “Kiken drugs,” as Governor-Designated Drugs based on their chemical structures and toxicological profiles. While most NPS toxicities have been assessed through behavioral toxicity tests in mice and in vitro pharmacological tests, standardized assays for hallucinogens remain lacking. Here, we report a newly implemented head-twitch response (HTR) assay in mice to evaluate hallucinogenic NPS. HTR is a rapid head movement induced by hallucinogens in rodents, difficult to count visually. Initially, behaviors were quantified by replaying recorded videos at slow speed for the NPS surveillance project. To increase throughput, we adopted a magnetometer method based on electromagnetic induction, achieving ~99% accuracy compared with video scoring but still requiring laborious video analysis. We then developed a simplified filtering approach, enabling semi-automatic analysis. This method offers a balanced solution for rapid and accurate NPS regulation, significantly reducing analysis time despite a slightly higher error rate. Using HTR tests, 15 substances were regulated by fiscal year 2024. Furthermore, a comparative analysis of emerging LSD-like prodrugs—1cP-LSD, 1V-LSD, and 1T-LSD—showed hallucinogenic activity, though weaker than LSD.

Keywords: illegal drug, hallucinogens, head twitch response, HTR, LSD, tryptamine, phenethylamine, prodrug, magnetometer

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

^b Bureau of Public Health, Tokyo Metropolitan Government 2-8-1, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, Japan

^c Bureau of Public Health, Tokyo Metropolitan Government, at the time when this work was carried out

^d Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University 1-1-20 Shin-machi, Nishitokyo-shi, Tokyo, Japan

^e Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science 6-3-1 Shinjuku, Katsushika-ku, Tokyo, Japan