

## 総説

# 危険ドラッグの生体影響試験について

宮澤眞紀

## Neurobehavioral assays to evaluate the effect of illegal drugs

Maki MIYAZAWA

Key Words : 危険ドラッグ, 条件付け場所嗜好性試験, CPP 試験

### はじめに

近年、麻薬や覚せい剤と同様に、興奮、多幸感や幻覚作用を得るために危険ドラッグが流通し、乱用による交通事故や救急搬送が頻発し大きな社会問題となっている。危険ドラッグは、麻薬や覚せい剤の代替として使用され、化学構造も従来の麻薬や覚せい剤成分の側鎖を変化させた類似化合物であり、数百以上の物質が存在し、ほとんどが新規化合物である。

危険ドラッグを迅速に規制するため、2007年に薬事法（現医薬品医療機器等法）が改正され、乱用の実態があるものについては指定薬物として規制されることとなった<sup>1)</sup>。しかし、特定の危険ドラッグを指定して規制しても、類似の化学構造を有する危険ドラッグがすぐに流通し、いわゆるいたちごっこの状態が長く続いている。

一方、これらの指定薬物については、事件、事故が起こっているにもかかわらず、有害性に関する科学的データは少ない。特に依存性に関する情報は指定薬物の指定に必須の情報ではなく、ほとんどない状態である。

そこで本総説では、当所で行った危険ドラッグの依存性試験を中心に、危険ドラッグの生体影響を測定する動物実験について報告する。

### 危険ドラッグとは

危険ドラッグの流通が問題になり始めた1998年頃は、これら乱用薬物が麻薬や覚せい剤などの規制薬物ではないために合法ドラッグと呼ばれていた。しかし、その実態は法律による規制の網をすり抜けるために化学構造を

改変した規制薬物の類似物質であることから、脱法ドラッグと呼ばれるようになった。その後、その違法性や問題性を明確にするために、2005年に厚生労働省は“違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）”と呼び方を改め法規制を進めたが、事件事故が頻発したため、その危険性を周知することを目的に、2014年より危険ドラッグという呼称に再度改めた<sup>2)</sup>。

危険ドラッグは粉末や液体、植物などの形状で流通し、人体に使用することを製品に表記することは違法になるため、クリーナー、バスソルト、ハーブ、お香等の名目で販売されていた。デザイン性が高いパッケージを使用し、主にインターネットや路上で販売され、カプセルトイによる販売などもあり、比較的安価であることから、未成年や20代の若者に急速に浸透していった。

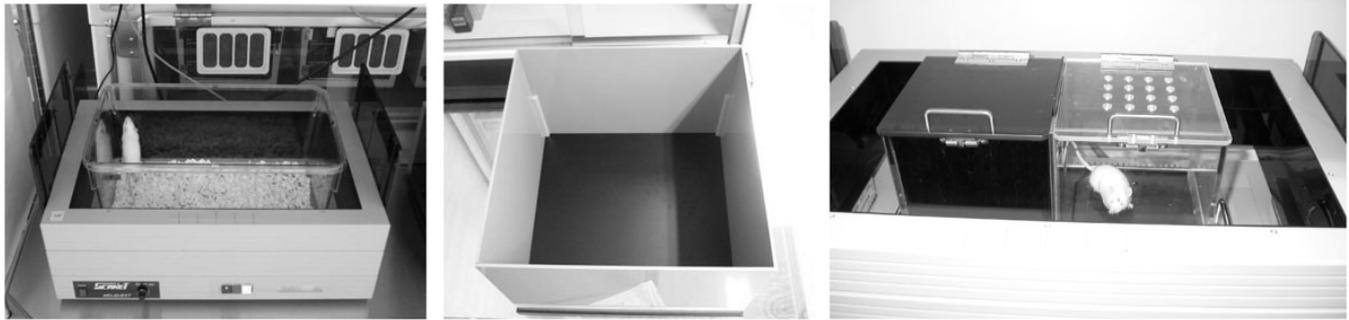
流通する化学物質も法規制の網をかいくぐり、様々に変化している<sup>3,4)</sup>。亜硝酸イソアミル（2007年指定薬物）などの亜硝酸アミル、BZP（1-benzylpiperazine, 2003年麻薬指定）などのピペラジン類、5-MeO-DIPT（5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine, 2005年麻薬指定）などのトリプタミン類、2C-T-7（2,5-dimethoxy-4-(n)-propylthiophenethylamine, 2006年麻薬指定）などのフェネチルアミン類、methyline（2007年麻薬指定）などのカチノン類、JWH-018（1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole, 2012年麻薬指定）などの合成カンナビノイド類等が主な化合物である。近年では、AH-7921（3,4-dichloro-N-[[1-(dimethylamino)cyclohexyl]methyl]benzamide, 2015年麻薬指定）などのオピオイド受容体に作用する薬物、diphenidine（1-(1,2-diphenylethyl)piperidine, 2014年指定薬物）などのフェンサイクリジン系薬物や一酸化二窒素（2016年指定薬物）など新たな物質が流通している。

### 危険ドラッグの作用

危険ドラッグは、麻薬、覚せい剤や向精神薬など既存の向精神作用を有する規制薬物の類似化合物である。したがって、規制薬物と同様に中枢神経系に作用し、興奮、鎮静、幻覚、多幸感などをひきおこすことを期待して使用される。しかし実際は、規制薬物の化学構造の一部が変化しただけで既存の規制薬物より強い薬理作用を有する化合物がある一方、作用が消失している化合物もある。また、予想外の毒性作用を有する可能性もあり、個々の化合物について生体影響を明らかにする必要がある。

### 危険ドラッグの生体影響試験

危険ドラッグの危険性は、化学構造、神経伝達物質の動態、動物への行動影響や神経毒性作用等によって評価



clear plastic cage  
(41.5 × 25 × 18.5cm)  
in locomotor activity  
measuring system

open field apparatus  
(45 × 45 × 30cm)

light/dark box  
(29 × 15 × 10cm)

Fig. 1 Apparatus for detecting neurobehavioral effects on illegal drugs

される。危険ドラッグが引き起こす興奮、多幸感、幻覚や依存性といった生体影響を明らかにするために、様々な細胞試験や動物実験が行われている。

細胞試験としては、培養神経細胞株を用いた細胞毒性試験や神経伝達物質受容体やモノアミントランスポーターに対する作用測定など、動物実験では、マイクロダイアリシス法による中枢神経内のモノアミンなどの神経伝達物質測定、自発運動量測定、神経毒性試験および行動薬理試験、依存性試験などが実施されている。

当所では、「合法ドラッグ」として危険ドラッグが社会問題化した2003年頃より、危険ドラッグの生体影響を明らかにし、その危険性を周知するため、自発運動量測定試験、神経毒性試験および行動薬理試験、依存性試験として条件付け場所嗜好性試験を行っている。

1. 実験動物および飼育条件

危険ドラッグの生体影響について動物実験を行う場合、実験に供する十分量の薬物の確保が難しいため、体重が軽いマウスを用いる。当所では、8~13週齢の雄性マウス(Slc:ddY 日本エスエルシー)を使用した。飼料(CE-2 日本クレア)および水道水は自由摂取させ、室温23±3℃、湿度50±10%、12時間の明暗サイクル条件下で1ケージ当たり5匹で飼育した。マウスは購入から1週間は同条件下で馴化後実験に使用し、実験中は1ケージ当たり1匹で飼育した。

2. 行動薬理試験

行動薬理試験は、実験動物の行動や神経症状を観察することによって、ヒトでの神経系への影響を類推するために行う。動物の行動や神経症状を観察し、有用な指標行動(症状)の発生頻度や重篤度を数値化して行動プロフィールを作成し評価するものであるが、客観的かつ総

Table 1 Functional and observational tests

Behavioral	Neurologic	Autonomic
Body position	Convulsion	Respiration rate
Stereotypy	Tremor	Piloerection
Parapebral closure	Gait	Lacrimation
Bizarre behavior	Tail elevation	Salivation
Pinna reflex	Body tone	Defecation
Approach response	Abdominal tone	Urination
Touch response	Limb tone	Skin color
Aggression	Grip strength	Heart rate
Vocalization	Finger splay	Body temperature
Locomotor activity	Righting reflex	
Rearing	Wire maneuver	
Transfer arousal		
Tail pinch response		
Visual placing		

合的な判定は難しく、複数の熟練した観察者による評価が必要である。また、一部の危険ドラッグの主要な作用である幻覚症状をマウスなどのげっ歯類で判定することは容易ではない。

当所では、薬物の神経作用を確認するために、マウスを用いてIrwinの多次元観察法<sup>5)</sup>を簡便化した観察表に従い、行動観察および数種類の機能試験を行った。使用した装置をFig.1に示す。

マウスに被験物質を経口投与後15分間ホームケージ内で観察し、15分間の自発運動量測定、5分間のオープンフィールドでの行動観察後、刺激反応試験、体温測定および機能試験を行った。観察項目は、症状発現の有無や強度で評価し、正常は0、促進は1または2、抑制は-1または-2でスコア化した。観察および測定項目をTable 1に示す。動物への投与経路は、使用実態に即した経口投与が適しているが、投与30分以内に神経症状

を発現させるため、一部危険ドラッグについては腹腔内投与を行った。指標行動等の発現強度の容量依存性を確認するため、複数の投与量群を設定し、一群あたりの投与匹数は6から8匹とした。

### 3. 自発運動量測定試験

自発運動量測定試験は、運動量解析装置により被験物質投与後の自発運動量を測定する試験で、当所では小動物三次元運動解析装置 (SCANET SV-20, メルクエスト) を用いた。水平方向と垂直方向の動物の動きをセンサーでとらえて数値化し、それぞれ自発運動量、立ち上がり回数としてカウントするものである。プラスチックケージ (41.5×25×18.5cm) をSCANET内に設置し、投与30分前からマウスをケージに入れて馴化させた後に被検物質を投与し、1分間隔で180分間測定した。

自発運動量測定試験は、危険ドラッグの興奮作用や鎮静作用を評価する方法として有効である。

### 4. 条件付け場所嗜好性試験

薬物の精神依存性を評価する方法には、薬物自己投与試験、薬物弁別試験、条件付け場所嗜好性試験 (conditioned place preference test ; CPP試験) などがある<sup>6)</sup>。

薬物の精神依存性を評価する方法の中で最も信頼性の高い方法は薬物自己投与試験で、薬物摂取行動の強化効果を評価する方法である。一方CPP試験は、薬物の依存性を報酬効果から予測する方法である。自己投与法による薬物の強化効果とCPP試験による薬物の報酬効果はよく対応することから、報酬効果から薬物の精神依存形成能を予知することが可能であると考えられている<sup>7)</sup>。

CPP試験は操作が簡単で短期間で報酬効果を評価することができる。また、報酬効果の発現強度を容量反応性から検討できるなどの有用性があり、本方法を用いた報告が多くなっているが、安定的な結果を得るためには、環境 (環境刺激) が重要な因子となる<sup>6,7)</sup>。CPP試験は仕切り可能な明暗2つのコンパートメントに分かれた明暗ボックスを用いて試験を行う。動物は暗ボックスを好む傾向があるため、照明を暗くし、床素材を工夫して明暗各ボックスでの滞在時間のバランスをとる必要がある。当所では、照明や床素材の検討に加えて前試験で滞在時間に偏りがないマウスを選別し、条件付け試験で被検物質処置ボックスを本来好まない明ボックスに固定することによってばらつきの少ない結果を得ることができた。当所で行っているCPP試験の詳細は以下のとおりである。

**4-1. 前試験** マウスを仕切りのない明暗ボックスに入れ、15分間の各ボックスの滞在時間比 (明ボックス/暗ボックス) を3日間連続で測定し、3日目の滞在時間がほぼ等しい動物を選別した。また、3日目の明ボックスの滞在時間をpre-conditioned score (秒)

とした。

**4-2. 条件付け試験** 薬物による条件付け試験は、4日目から実施した。薬物投与群では薬物を腹腔内投与し、仕切りを閉じた明ボックス (被検物質処置ボックス) に30分隔離した。対照群には生理食塩液を投与し、暗ボックスと同様に隔離した。24時間後、薬物投与群、対照群ともに生理食塩液を投与し、前日のボックスの反対側に30分隔離した。この2日間の操作を1セットとし、この操作を3または5回繰り返し、条件付けを行った。

**4-3. 本試験** 条件付け試験終了翌日に、仕切りを取った明暗ボックスに何も投与しないマウスを15分間入れ、明ボックスでの滞在時間を測定し、post-conditioned scoreとした。

**4-4. CPP score** post-conditioned scoreからpre-conditioned scoreを引いた値をCPP scoreとし、この値を対照群と投与群で比較して報酬効果を評価した。マウスは暗ボックスを好むため、条件付け試験で何も投与しなければ環境に慣れ、CPP scoreはほぼマイナスになることを確認している。薬物投与群においてCPP scoreがプラスになっている場合、薬物報酬効果により本来好まない明ボックスの滞在時間が長くなると解釈できる。対照群は条件付け試験において暗ボックスで生理食塩液の腹腔内注射をされており、CPP scoreは注射のストレスにより暗ボックスへの嗜好性が減弱された値であると解釈される。

## CPP試験の結果

当所で行った CPP試験の結果について解説する。

試験に使用した危険ドラッグは、試薬メーカーから購入した試薬以外は、インターネットで購入したものであり、内容物の成分や純度を確認する必要があった。そのため、インターネットで購入した危険ドラッグはGC-MSによって性状を確認し、HPLCで純度を測定して使用した。分析条件の詳細は、清水らの方法<sup>8)</sup>に従った。

### 1. トリプタミン系薬物

トリプタミン系危険ドラッグは、危険ドラッグが顕在化し始めたころに数多く流通していたが、現在ではほとんど流通していない化合物である。神経伝達物質であるセロトニンはトリプタミン類に属するため、トリプタミン系危険ドラッグはセロトニン受容体に作用し、幻覚作用を持つと考えられる<sup>9)</sup>。代表的なものにAMT ( $\alpha$ -methyltryptamine, 2005年麻薬指定) や死亡事故が多発した5-MeO-DIPT等がある。

**1-1. 被検物質** 6種類のトリプタミン系化合物-5-MeO-DIPTおよびその構造異性体である5MeO-DPT

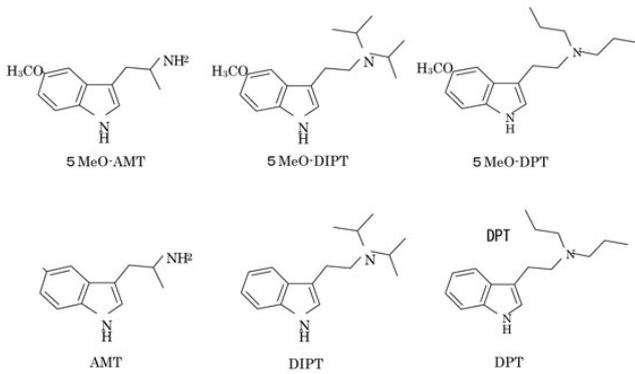


Fig. 2 Chemical structures of tryptamines tested

(5-methoxy-N,N-dipropyltryptamine, 2007年指定薬物), DIPT (N,N-diisopropyltryptamine, 2007年指定薬物), DPT (N,N-dipropyltryptamine, 2007年指定薬物), AMT, 5MeO-AMT (5-methoxy- $\alpha$ -methyltryptamine, 2007年指定薬物) を用いてCPP試験を行った. AMT (Sigma-Aldrich) 以外の化合物はインターネットで購入した. 使用した被検物質の化学構造式をFig.2に示す.

1-2. CPP試験結果 6種類のトリプタミン化合物のCPP試験の結果, 5-MeO-DIPT, 5MeO-DPT, DIPTおよびDPTで, 対照群に対し投与群で有意にCPP scoreが高く, 報酬効果があることが明らかになった. 一方, 5-MeO-AMTおよびAMTでは報酬効果は確認で

きなかった. 結果をFig.3に示す. この結果から, 報酬効果の形成にはN側鎖の影響が大きい可能性が示唆された. 今回使用した6化合物のうち麻薬指定されている5-MeO-DIPTとAMT以外の化合物は指定薬物であるが, 指定薬物の中にも依存性薬物が存在する可能性があることが明らかになった.

2. フェネチルアミン系薬物およびメチロン

フェネチルアミン系の代表的な規制薬物は覚せい剤であるmethamphetamineなどであるが, 危険ドラッグとしても類似化合物が多く流通している. また, カチノン類もフェネチルアミン類に類似した構造を有し, 合成カンナビノイドとともに包括規制の対象となるほど危険ドラッグとして蔓延している. フェネチルアミン類およびカチノン類とも興奮作用や幻覚作用を有しているものが多いと考えられている<sup>10</sup>.

2-1. 被検物質 フェネチルアミン類であるMMD A-2 (2-methoxy-4,5-methylenedioxyamphetamine, 2007年指定薬物), methamphetamineとカチノン類のmethyloneについて CPP試験を実施した.

methamphetamine (大日本住友ファーマ) 以外の化合物は, インターネットから購入した. 使用した被検物質の化学構造式をFig.4に示す.

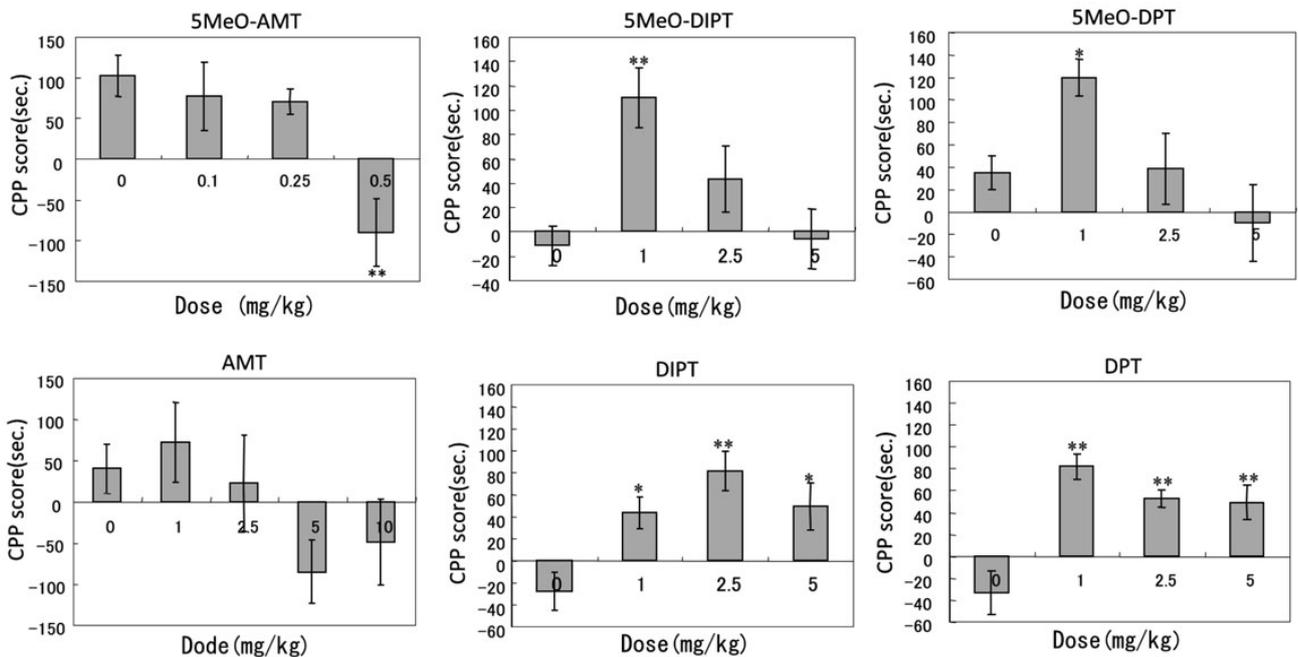


Fig. 3 Results of tryptamines on the CPP test.

Mice were injected with each tryptamine. CPP score was expressed in scores calculated as the difference between post-conditioning and pre-conditioning time spent in the compartment treated with tryptamines. Data are represented as the mean  $\pm$  SD of 10-14 mice. \*P<0.05, \*\* P<0.01, indicates significant difference from the saline treated group.

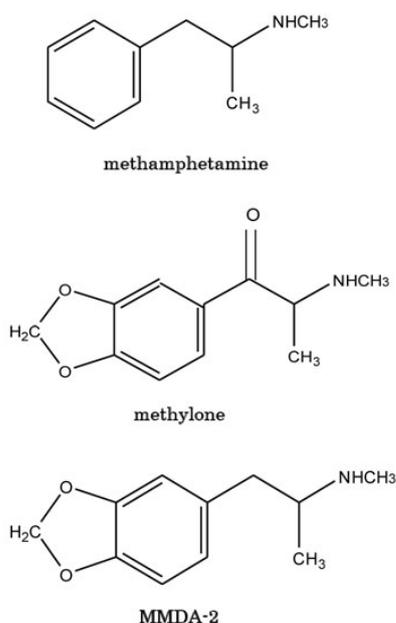


Fig. 4 Chemical structures of methamphetamine, methylone and MMDA-2

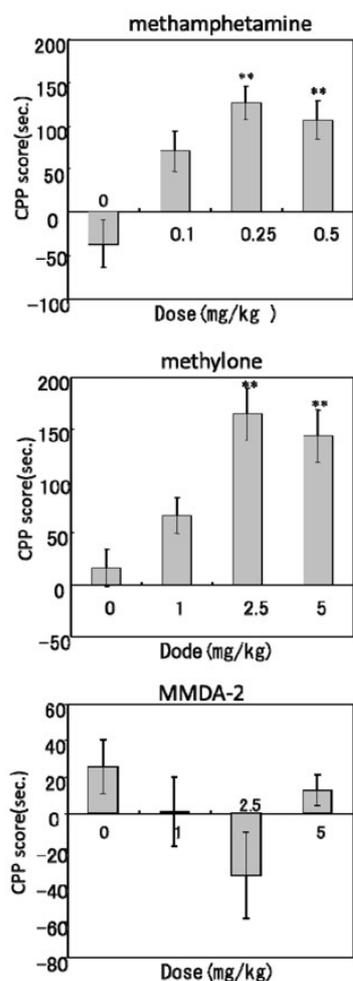


Fig. 5 Results of methamphetamine, methylone and MMDA-2 on the CPP test.

2-2. CPP試験結果 methamphetamine および methyloneとも有意な報酬効果が認められた。強力な依存性物質であるmethamphetamineでは、methyloneの十分の一の量かつ条件付け試験3セットで報酬効果が発現した。

MMDA-2 はMDMA (3,4-methylenedioxyamphetamine, 麻薬) の主要代謝物であるMDA (3,4-methylene-dioxyamphetamine, 麻薬) と同様の作用があると報告されている<sup>11)</sup>が、当所の実験では報酬効果は認められず、低濃度投与群で明ボックス滞在時間が減少し、嫌悪作用を有する可能性が示唆された。

#### おわりに

CPP試験以外の試験でも、自発運動量測定試験の結果AMTは自発運動量の有意な増加を、5-MeO-AMTは自発運動量の有意な減少を引き起こしたが、dipropyl基を持つ4化合物では自発運動量の変化は認められなかった。また、dipropyl基を持つ4化合物では5methoxy基が存在することにより神経毒性作用が増強される傾向にあった。MMDA-2 はMDMAとは異なり自発運動量は減少傾向にあり、MDMAで認められる中枢神経作用は観察されなかった。また、methyloneもMDMAと極めて類似した構造を持つが、自発運動量はMDMAより高く、報酬効果を示す量は2.5mg/kgであり10mg/kgと過去に報告<sup>12)</sup>されているMDMAより低かった。以上のように、同系統の薬物であっても化合物の側鎖の違いにより生体作用は異なっており、その構造から生体影響を正確に予測することは容易ではない。

合成カンナビノイドやカチノン系化合物が構造活性予測をもとに包括規制され、危険ドラッグの法規制が強化されたことから、その流通は下火になったように見えるが、新規薬物の出現は続いている。

医療機関からの報告では、最近の危険ドラッグ中毒症例の特徴として重症化や常用化が示唆されている<sup>13)</sup>。乱用薬物の危険性の周知や薬物依存症対策の強化のために、新規薬物の検出方法や生体影響試験に関する研究をとおして貢献していくことが公的研究機関には求められている。今後も、現在ではマウスでは評価が難しい幻覚作用の指標行動の検討や依存性試験を含めた詳細な行動毒性実験を行い、危険ドラッグ成分の生体影響を解明していく必要がある。

#### 謝辞

本研究は、神奈川県重点基礎研究および厚生労働科学研究費により実施しました。本稿を終えるにあたり、研究に協力していただいた理化学部薬事毒性食品機能グルー

プの皆様および帝京科学大学小島尚教授に深謝します。

#### 参考文献

- 1) 内閣府：ストップ危険ドラッグに手を出すな  
<[https://www8.cao.go.jp/souki/drug/stop\\_drug.html](https://www8.cao.go.jp/souki/drug/stop_drug.html)> (2019/8/8アクセス)
- 2) 厚生労働省：議員立法による法改正  
<[https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iyakuhin/yakubuturanyou/oshirase/20150819-1-02.html](https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/yakubuturanyou/oshirase/20150819-1-02.html)> (2019/8/8アクセス)
- 3) 花尻 (木倉) 瑠理：危険ドラッグの規制と流通実態について, 薬剤学, **75**, 121-127 (2015)
- 4) 鈴木勉：危険ドラッグの乱用と規制, 日薬理誌, **150**, 124-128 (2017)
- 5) Irwin S. : Comprehensive observational Assessment Ja. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse, Psychopharmacologia, **13**, 222-257(1968)
- 6) 鈴木勉：薬物の報酬効果測定法－CPP (条件づけ場所嗜好性) 試験について, 日薬理誌, **114**, 365-371 (1999)
- 7) 船田正彦：条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価：基礎と応用, 日薬理誌, **126**, 10-16 (2005)
- 8) Shimizu E, Watanabe H, Kojima T, Hagiwara H, Fujisaki M, Miyatake R, Hashimoto K. : Combined intoxication with methylone and 5-MeO-MIPT, Progr Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, **31**, 288-291(2007)
- 9) Nagai F, Nonaka R, Satoh H, Kamimura K.:The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain, Eur J Pharmacol, **559**, 132-137(2007)
- 10) 佐藤かな子, 福森信隆, 中野良一, 不破達, 田中豊人：違法ドラッグ生体影響試験の開発, 東京都健康安全研究年報, **60**, 21-35(2009)
- 11) Shulgin, A. and Shulgin, A. : PiHKAL, pp.792-795, Transform Press, Berkley(1992)
- 12) Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F. : Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice, Br J Pharmacol, **140**, 831-838(2003)
- 13) 明石暁子, 柏浦正弘, 三上学, 濱邊祐一：危険ドラッグ中毒の深刻化の現状, 中毒研究, **29**, 21-25(2016)

## Neurobehavioral assays to evaluate the effect of illegal drugs

Maki MIYAZAWA

Various psychoactive drugs are widely used recreationally throughout the world. Most non-controlled psychoactive drugs are synthesized to be chemically similar to illegal drugs. Because of their similar structures, they are expected to produce similar effects on their users. The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare amended the Pharmaceutical Affairs Act to control quickly the use of these drugs in 2007. In vivo tests, such as neurotoxicity tests and behavioral tests, for evaluating the hazards of illegal drugs, are being conducted, but there are limited data on dependency tests.

In this review, the method of the conditioned place preference (CPP) test in mice is described and the dependent effects of some tryptamines and phenethylamines are evaluated.