違法ドラッグ生体影響試験の開発～*in vivo* 試験系～

小縣昭夫,^{*,a} 佐藤かな子,^a 不破 達,^a 田中豊人,^a 長澤明道,^a
 湯澤勝広,^a 矢野範男,^a 安藤 弘,^a 久保喜一,^a 高橋 博,^a
 大山謙一,^a 宮澤真紀,^b 小島 尚^{b,c}

In Vivo Screening of Illegal Drug

Akio Ogata,^{*,a} Kanako Satoh,^a Tatsu Fuwa,^a Toyohito Tanaka,^a Akemichi Nagasawa,^a
 Katsuhiko Yuzawa,^a Norio Yano,^a Hiroshi Ando,^a Yoshikazu Kubo,^a Hiroshi Takahashi,^a
 Ken-ichi Ohyama,^a Maki Miyazawa,^b and Takashi Kojima^{b,c}

^aTokyo Metropolitan Institute of Public Health; 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; ^bKanagawa Prefectural Institute of Public Health; 1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan; and ^cTeikyo University of Science; 2525 Yatsusawa, Uenohara, Yamanashi 409-0193, Japan.

(Received August 17, 2012)

The neuro-behavioral observation scorebook that improved the previous observation methods of Irwin was followed, the test material was administered to 5 mice per each group, and the mean value of the obtained score was determined. The behavior of a normal animal was assumed to be point 0, animals showing suppressive behavior were scored in the minus region, and animals that showed excitement behavior were scored in the plus region. Each score was divided into three stages, according to the level of strength of the biological effect. The score of each observation item was totaled, and the level of the strength of the biological effect in the item was judged according to its mean value. These test methods of neuro-behavioral observations we proposed were able to detect the biological effects of a drug simply and promptly, and contributed sufficient data to support an administrative measure aimed at anticipating and improving the prevention of health damage in humans by non-regulated drugs from a scientific perspective. Recently, we developed a method of serial measurement of the quantity of monoamine in the mouse central nervous system by microdialysis, and performed it. The Kanagawa Prefectural Institute of Public Health conducted a study of the biological effect of non-regulated drugs. A characteristic here is what they examined about drug-dependency other than observing the behavior of the animal.

Key words—screening method; neuro-behavioral observation; mouse; non-regulated drug

1. はじめに

平成 17 年 4 月、東京都は国に先駆け、脱法ドラッグの濫用防止に関する条例を制定した。この条例の特徴は脱法ドラッグを知事指定薬物として規制できるところにある。知事指定薬物の指定に際しては、科学的根拠に基づき、東京都薬物情報評価委員会の意見を聴いて、都が独自に行う。しかしなが

ら、多種にわたる脱法ドラッグの科学的根拠に基づいた情報は少なく、とりわけ、生体影響に関してはヒトでの健康被害報告がわずかにあるくらいである。そのため、薬物を知事指定薬物として指定する際の生体影響に関する情報が必要とされた。

われわれは知事指定薬物の指定に際し、科学的判断材料の 1 つとして、実験動物を用いた生体影響に関する資料を提供することを目的に、簡易、迅速に行える試験法、特に、行動及び神経症状観察の方法について検討している。ここでは、これまでに東京都健康安全研究センターで開発した *in vivo* スクリーニング試験法を紹介するとともに、神奈川県衛生研究所において行っているドラッグの生体影響試験のうち薬物依存性に関する試験法についても紹介

The authors declare no conflict of interest.

^a東京都健康安全研究センター (〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1), ^b神奈川県衛生研究所 (〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-1), ^c帝京科学大学 (〒409-0193 山梨県上野原市八ッ沢 2525)

*e-mail: Akio_Ogata@member.metro.tokyo.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S09 で発表したものを中心に記述したものである。

する。

2. 東京都健康安全研究センターで実施している 違法ドラッグに関する *in vivo* 試験

2-1. 動物の行動・神経症状観察に関する試験¹⁻³⁾

2-1-1. 実験動物 CrIj:CD1 (ICR) 雄マウスを日本チャールス・リバー(株)より5週齢時に購入、6週齢に達した発育良好なものを選び試験に使用する。

本試験にマウスを用いた理由の1つは、脱法ドラッグの大量入手が困難であり、試験に供せる量が限られるため、ラットでの実施は困難であることなどのほか、マウスは取り扱いが比較的容易であること、経費的にもラットに比べて安価であることなどが挙げられる。

また、雌雄については、雌マウスの生理的変動による薬物反応の変化を避けるため雄を用いることにした。

2-1-2. 飼育条件 動物は、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) の飼育室にて日本クレア製固形飼料 CE-2 及び水道水を自由に与え、プラスチックケージに 1 匹飼いとす。

2-1-3. 被検物質 基本的には、脱法ドラッグとして販売されているものを購入し、当センター医薬品研究科により精製されたものを用いる。また、生体作用を示す陽性対照物質として、コカイン (興奮作用)、メタンフェタミン (覚醒作用)、ガンマヒドロキシ酪酸 (gamma-hydroxybutyric acid; GHB, 抑制作用) などを使用するほか、既に生体影響試験を実施し、その作用がわかっている化学構造の類似したものを陽性対照物質としておく。

2-1-4. 投与量、投与回数及び投与匹数 被検物質の投与量については、脱法ドラッグとしてヒトが使用すると推定される量の 100 倍量を最高濃度として等比級数的に希釈して投与することを基準にした。この数値は、ヒトと動物における種差としての不確実係数 10、及び個体差としての不確実係数 10 の積を根拠としている。この 100 倍という量は、まだ化学構造の知られていない未知の脱法ドラッグの生体作用の有無を迅速に判定するスクリーニング試験での投与量の目安として有用と考えられる。

投与回数は 1 日 1 回、3 日間連続投与とした。投与回数について 3 日間連続としたことについては、

1 回目の投与では、動物の動きを中心にした観察を行い、2 回目の投与では驚愕反応など、動物に刺激を加えたときの観察を中心に、3 回目の投与ではビデオ撮影による記録を中心に行うことを考えた。さらに連続投与による薬物作用の減弱あるいは増強などの変化についても観察が可能であり、薬物の生体内における排泄速度の類推も可能な回数と考える。

投与匹数については、投与できる薬物の量も限られていることから、統計的に最少有効匹数である 5 匹とした。

2-1-5. 観察方法 行動及び中枢・自律神経症状観察では Irwin⁴⁾ の多元観察法を改良した行動及び神経症状観察得点表を作成した。1 群 5 匹のマウスに被検物質を投与し、得られたスコアの平均値を求めた。正常な動物の行動を 0 に置き、抑制作用の認められるものはマイナスに、興奮作用の認められるものはプラスに、強さの程度に応じて、それぞれ 3 段階の得点 (抑制作用; -1, -2, -3, 興奮作用; +1, +2, +3) を与えた。観察項目毎に得点を合計し、その平均値を求め、その項目における生体作用の強度を判定した。

Table 1-3 にわれわれが作成した、行動及び中枢・自律神経症状観察の得点表を示す。

2-1-6. 評価手法 行動及び神経症状観察で得られた数値により以下の取り扱いを行った。すなわち、すべての観察項目について、5 匹の得点の平均の絶対値が、 $0 \leq \text{数値} \leq 0.4$ の範囲であった場合は生体影響は観察されないものとし、以後の試験は行わない。観察項目の 1 つでも数値が $0.6 \leq \text{数値} \leq 0.8$ の範囲であった場合は再度、本方法による試験を実施し、その結果、同様の数値を示したものについては生体影響が弱いながらもあると判定する。数値が $1.0 \leq \text{数値} \leq 3.0$ の範囲であった場合は薬物の影響が強く疑われ、生体影響があると判定する。

2-2. 自発運動における運動量の測定³⁾ われわれは、上述した目視的観察のほかに、運動量解析装置を用いた観察も行っている。自発運動の指標となる運動量の測定は小動物運動解析装置 (SCANET CV-40) を用い、10 分毎の経時的変化を投与後 3 時間まで測定する。運動量の測定は、以下の 4 つの項目について解析を行う。

- a. 総運動量: 10 分間にセンサーを横切った回数

Table 1. Observation Items in General Behavior and the Score in Symptom

Observation items	Suppressive behavior			Normal	Exciting behavior		
	−3	−2	−1	0	+1	+2	+3
Aggressiveness				No reaction	Reaction a little	A lot of reaction	Very strong
Passivity	Not escape	Hardly run away	Run away a little	Escape from holding			
Stereotypy				Usual frequency	A little	A lot of frequency	Numerous
Grooming	Not at all	Small frequency	A little few	Moves moderately	A little lot	A lot of frequency	Numerous
Vocalization				Not vocalize	A little vocalize	A lot of vocalization	Vocalize numerously
Sound response	Not respond	Weak	A little weak	Respond	A little strong	Strong	Excessive
Touch response	Not respond	Weak	A little weak	Respond	A little strong	Strong	Excessive
Pain response	Not respond	Weak	A little weak	Respond	A little strong	Strong	Excessive
Verticalness	Not at all	Small frequency	A little few	Moves moderately	A little lot	A lot of frequency	Numerous

Table 2. Observation Items in Neurological Behavior and the Score in Symptom

Observation items	Suppressive behavior			Normal	Exciting behavior		
	−3	−2	−1	0	+1	+2	+3
Spontaneous activity	No activity	Hardly moves	Badly moves	Moves moderately	Good movement	A lot of momentums	Runs
Abnormal gait	Difficulty in walking	Walking staggeringly	Drag walking	Normal walking	Walking a little	Walking busily	Junping up and down
Abnormal position	Difficaulty maintenance	Instability position	Inclines a little	Normal position			
Muscle tone	Insensibility	Weak	A little weak	Moderate resistance	A little strong	Strong	Rigor
Strau's tail reaction				No reaction	A little	A lo of	Numerous
Righting reflex	Not get back	Take 5 seconds to get back	A little slow	Get back immediately			
Pinna reflex	Not brushes	Weak	A little weak	Dislike and brushes off	A little strong	Strong	Excessive reaction
Corneal reflex	No response	Weak	A little weak	Shut eyelid	A little strong	Strong	Excessive reaction
Tendon reflex	No response	Weak	A little weak	Kick foot	A little strong	Strong	Excessive reaction
Tremor				Not tremble	Tremble a little	Tremble	Tremble violently
Convulsion				Not convulse	Convulse a little	Convulse	Convulse violently
Grip strength	Not grasp	Weak	A little weak	Normal	A little strong	Strong	Grasp strongly
Detached finger	Open greatly	Open finger	Close a little	Close			

Table 3. Observation Items in Autonomical Behavior and the Score in Symptom

Observation items	Suppressive behavior			Normal	Exciting behavior		
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
Exophthalmos				Not come out	A little come out	Come out	Come out strongly
Pupil size	Very small	Small	A little small	Normal	A little big	Big	Very big
Palpebral opening	Full close	Close a half	Close a little	Normal opening	Open a little	Open a half	Full open
Shed tears				Normal	A little lot	A lot	Numerous
Urination	Very few	Few	A little few	Normal	A little lot	A lot	Numerous
State of excrement	Diarrhea	Loose	Loose a little	Normal	Hard a little	Hard	Very hard
Frequency of excrement	Very few	Few	A little few	Normal	A little lot	A lot	Numerous
Salivation				No salivation	A little lot	A lot	Numerous
Respiratory rate	Very few	Few	A little few	Normal	A little lot	A lot	Numerous
Heart rate	Very few	Few	A little few	Normal	A little lot	A lot	Numerous
Piloerection				No erection	Erect a little	Erect	Erect violently
Temperature	Very low	Low	A little low	Normal	A little high	High	Very high
Skin color	Very white	White	A little white	Normal	Redness a little	Redness	Very red

- b. 大きい運動量：1回の移動距離が3 cm以上で10分間にセンサーを横切った回数
- c. 総移動距離：10分間の移動距離の和
- d. 立ち上がり回数：10分間での立ち上がりの回数

2-3. 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^{3,5,6)} この試験法は、局所微量透析（マイクロダイアリシス）法によって、自由行動下のマウスの大脳基底核・線状体から神経伝達物質モノアミンを含む生体試料を経時的に採取し、薬物投与による神経細胞外モノアミンであるドーパミン（dopamine; DA）、セロトニン（5-hydroxytryptamine; 5-HT）並びにノルエピネフリン（norepinephrine; NE）量の経時変化を微量生体試料分析装置（高速液体クロマトグラフ（HPLC）・電気検出器）によって測定し、その増減により、薬物の神経系への生体影響を調べる方法である。

2-4. 実験動物の取り扱い 上述した試験は当センターでの動物実験委員会において許可されたものであり、実験動物の取り扱いについては当センターの取扱規程及び UFAW の取扱いに準拠して行っている。

3. 神奈川県衛生研究所で実施している薬物の依存形成に関する検討

神奈川県衛生研究所（神奈川衛研）では、東京都で行っている行動観察や運動量の測定に加え、薬物の依存性試験を行っている。⁷⁾

この試験法は条件付け場所嗜好性試験（conditioned place preference; CPP 法）⁸⁾といわれるもので、明ボックスと暗ボックスの間のしきり板にマウスが通り抜けられる程度の間隔が空いた明暗ボックスを用いる。

3-1. 前試験 薬物非投与マウスを明・暗ボックスに入れ、15分間における各ボックスの滞在時間比（明ボックス/暗ボックス）を測定する。

3日間連続で行い、滞在時間がほぼ等しい動物を試験に使用することとし、3日目の測定結果を前試験の値とする。

3-2. 条件付け 投与群は薬物を腹腔内投与し、仕切りを閉じた明ボックスに30分間入れる。対照群は生理食塩液を投与し、暗ボックスに30分間入れる。24時間後、投与群と対照群ともに生理食塩液を投与し、各群は前日のボックスと反対側に30分間入れる。この操作（2日間）を1セットとし、

この条件付けを3又は5セッション繰り返す。

3-3. 本試験 条件付け24時間後、薬液を投与せずに明・暗ボックスに入れ、15分間の各ボックスでの滞在時間を測定し、明ボックスでの本試験と前試験の滞在時間の差を算出する。この値を対照群と投与群で比較し、依存性形成を判定する。

4. おわりに

以上、本総説は東京都及び神奈川県での違法ドラッグの *in vivo* 試験法を述べた。

この稿を書いている頃、連日のように薬物乱用による社会的事故が新聞にとりあげられている。薬物乱用は国際的にも重大な問題であり、その防止には多角的な対応が求められている。使用者は乱用者の100倍ともいわれ、法の隙間をくぐり抜ける違法（脱法）ドラッグのような薬物乱用を放置することはできない。上述した試験を実施することで、薬学は信頼性の高いデータを提供するとともに、情報の発信などを含めた薬物乱用防止での専門的な役割を果たす必要があると考えている。

REFERENCES

- 1) Fukumori N., Ando H., Kubo Y., Yuzawa K., Nagasawa A., Takahashi H., Yana N., Fuwa T., Ogata A., Uehara S., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.*, **58**, 293–297 (2007).
- 2) Fukumori N., Ando H., Kubo Y., Yuzawa K., Nagasawa A., Takahashi H., Yana N., Fuwa T., Ohashi N., Ogata A., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.*, **59**, 329–334 (2008).
- 3) Satoh K., Fukumori N., Fuwa T., Tanaka T., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.*, **60**, 21–35 (2009).
- 4) Irwin S., *Psychopharmacologia*(Berl.), **13**, 222–257 (1968).
- 5) Fuwa T., Fukumori N., Tanaka T., Kubo Y., Ogata A., Uehara S., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H.*, **58**, 287–292 (2007).
- 6) Fuwa T., Kodama T., Honda Y., Tanaka T., Kubo Y., Ohashi N., Nakae D., Ogata A., *ChemoBio Integrated Management*, **5**, 62–71 (2009).
- 7) Miyazawa M., Kojima T., Nakaji S., *Hirosaki Medical Journal*, **62**, 56–71 (2011).
- 8) Noda Y., Miyamoto Y., Mamiya T., Kamei H., Furukawa H., Nabeshima T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 44–51 (1998).