危険ドラッグ吸入曝露試験の開発

猪又明子,^{*,a} 小縣昭夫,^a 多田幸恵,^a 長澤明道,^a 湯澤勝廣,^a
安藤 弘,^a 久保喜一,^a 高橋 博,^a 海鉦藤文,^a 田中和良,^a
中嶋順一,^a 鈴木淳子,^a 植村望美,^a 守安貴子,^a 渡辺大介,^b
石原 恵,^b 宇佐美 孝,^b 亀井 学,^b 河野安昭^b

Inhalation Exposure Method for Illegal Drugs

Akiko Inomata,^{*,a} Akio Ogata,^a Yukie Tada,^a Akemichi Nagasawa,^a Katsuhiro Yuzawa,^a
Hiroshi Ando,^a Yoshikazu Kubo,^a Hiroshi Takahashi,^a Fujifumi Kaihoko,^a Kazuyoshi Tanaka,^a
Jun'ichi Nakajima,^a Atsuko Suzuki,^a Nozomi Uemura,^a Takako Moriyasu,^a Daisuke Watanabe,^b
Kei Ishihara,^b Takashi Usami,^b Satoru Kamei,^b and Yasuaki Kohno^b

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

^bHealth and Safety Division, Bureau of Social Welfare and Public Health, Tokyo Metropolitan Government; 2-8-1 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-8001, Japan.

(Received January 25, 2017; Accepted March 31, 2017)

We developed a new inhalation exposure method to evaluate effects of synthetic cannabimimetics that are being distributed as new, unregulated drugs in the Tokyo area. We selected the commercial product “SOUTOU” containing AB-CHMINACA and 5F-AMB as the test drug and dried marshmallow (*Althaea officinalis*) leaves as the negative control. A half cigarette packed with dried marshmallow leaves or SOUTOU was ignited, then mainstream smoke from each was delivered to five mice in an exposure box. After the cigarettes were fully consumed, neurobehavioral observations and a catalepsy test were performed at 15, 30 and 60 min after exposure. The effluent air from the exposure box was poured into impingers containing acetonitrile (first impinger) and dimethyl sulfoxide (second impinger). The resulting solutions were analyzed to assess decomposition of the synthetic cannabimimetics. Mice exposed to SOUTOU smoke showed many excitement behaviors and some suppressive behaviors at 15, 30 and 60 min. These clearly included cannabimimetic specific pharmacological actions. Negative control mice also showed some suppressive behaviors at 15 min but these were attenuated at later times, nearly disappearing at 60 min. In addition, the behavioral effects observed in controls were less pronounced than those in SOUTOU exposed mice. The inhalation exposure method developed in our study would be effective for determining cannabinoid specific pharmacological effects of illegal drugs, as well as for assessing the presence of active compound(s) by comparing the test substance with a negative control.

Key words—inhalation exposure; neuro-behavioral observation; synthetic cannabimimetics; mouse

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は、科学的根拠に基づくデータが必要となっており、科学的根拠に基づくデータの 1 つを得るために、実験動

物を用いた行動及び神経症状観察方法¹⁻⁴⁾を開発した。

この試験方法の概要は、被験物質を蒸留水に溶解し、実験動物に経口投与した後、30 分・1 時間・2 時間後に動物の行動及び神経症状を観察し、溶媒（蒸留水）を投与した対照群の行動及び神経症状と比較するものである。

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ている。ハーブ系の危険ドラッグは、*Althaea officinalis*（以下マリーシュマロウと表記）等の支持植物に合成カンナビノイド化合物の粉末をまぶした状態で販売

^a東京都健康安全研究センター、^b東京都福祉保健局健康安全部

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

されていることが多く、その使用法は、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。

合成カンナビノイドは水にほとんど溶解せず、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、既法を用いて経口投与や腹腔内投与により生体影響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曝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曝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スクリーニング法として、危険ドラッグを燃焼させて生じた主流煙を実験動物に曝露し、その動物の行動及び神経症状観察を行うための吸入曝露装置を開発し、その実用性を評価した。また、燃焼により合成カンナビノイドの成分が分解する可能性があることから、吸入曝露装置の排気を回収し、成分を分析することにより、燃焼によるこれら合成カンナビノイドの化学的な変化の有無について検証を行った。

試験薬物として、平成26年6月に東京都内で人身事故を起こした危険ドラッグ製品に含まれていた合成カンナビノイド化合物である AB-CHMINACA (1), 5-fluoro-AMB (5F-AMB, 2) (化学構造は Fig. 1) を用いた。

さらに、1-2 のヒトカンナビノイド受容体 (CB₁ 及び CB₂) に対するアゴニスト活性を明らかにするため、ヒトリコピナント受容体を用いて、³⁵S で標識した Guanosine 5'-(γ -thio) Triphosphate (³⁵S-GTP γ S) 結合を指標とした受容体機能評価試験を実施した。1-2 のアゴニスト活性の試験結果と、吸入曝露試験の結果とを比較検討し、開発した試験法の評価を試みた。

材料及び方法

1. 吸入曝露装置 吸入曝露装置は、人工呼吸器 (SN-480-5, シナノ製作所, 東京), 燃焼部, 曝露ボックス (塩化ビニル製, 容量 8020 cc, 前田製作所, 東京), ガス回収瓶 (SPC ミゼットインピンジャー, SIBATA, 草加: Impinger) により構成した (Fig. 2)。燃焼から排気までの空気の流れは以下の通りである。燃焼部で燃焼させた支持植物マー

Fig. 1. Chemical Structures of Synthetic Cannabimimetics 1-2 Dealt in This Study

シュマロウの煙を人工呼吸器で設定した空気量で吸引し、曝露ボックスの給気口に導入する。曝露ボックスの給気部にファン (E122535H, アース製薬, 東京) を設置し、流入した煙をボックス内に拡散させる。曝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, 大阪) と、ジメチルスルホキシド (2 本目: 特級, 和光純薬, 大阪) 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すべて安全キャビネット内に設置し、燃焼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、試験実施者及び環境への薬物の曝露及び放出を防御した。

2. 試験対象薬物及び陰性対照 試験対象薬物として、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薬物「総統」の任意提供品を用い、陰性対照として「総統」の支持植物として繁用されているマーシュマロウの葉部 (以下マーシュマロウリーフと表記) 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 (0.25 g) を高用量 (成分 1: 6.1 mg, 成分 2: 38.7 mg) (成分 1 及び 2 は、平成26年7月15日付けで指定薬物に指定) とし、その 1/10 量 (0.025 g) を低用量 (成分 1: 0.6 mg, 成分 2: 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みられず、高用量では曝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、成分の 1 及び 2 をそれぞれ

Fig. 2. Inhalation Exposure System

A: Ignition part, B: Exposure box, C: Impingers.

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、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、陰性対照にはマーシュマロウリーフ 0.25 g を使用した。

3. 実験動物 Crlj:CD1 (ICR) 雄マウス（日本チャールス・リバー，横浜）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 動物は，温度 23–25℃，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，東京）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. 吸入曝露試験 マーシュマロウリーフ（「総統」を添加したものも含む）を燃焼させるために，タバコ両切り用さや紙にこれらを充てんし，吸入曝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曝露ボックス（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，曝露ボックス内の空気が外気とほぼ入れ替わる 15 分後に，マウスを曝露ボックスから取り出し，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，曝露前にも行った。

6-1. 行動及び中枢・自律神経症状観察

Irwin⁵⁾ 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，5 匹のスコアの平均値を求めた。正常な動物の行動を 0 とし，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て平均値を求め，各項目における生体作用の強度を判定した。

Tables 1–3 に，行動及び中枢・自律神経症状観察の得点表を示す。

行動及び神経症状観察で得られた各観察項目の数値について，5 匹の平均得点の絶対値が $0 \leq \text{数値} \leq 0.4$ の範囲であった場合は，生体影響はないものとした。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，生体影響が疑われるとした。数値が $1.0 \leq \text{数値} \leq 3.0$ の範囲であった場合は，生体影響があると判定した。

6-2. 体温測定 マウス用体温記録計（AD-1687，エー・アンド・デイ，東京）を用いて，マウスの直腸温度を測定した。

曝露前の体温の $\pm 0.5^\circ\text{C}$ を正常範囲とし，正常範囲の下限から 1°C 低下する毎に抑制作用の得点（−1，−2，−3）を，上限から 1°C 上昇する毎に興奮作用の得点（+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「体温」〕。

6-3. カタレプシー試験 高さ 6.5 cm の針金の横棒にマウスの前脚をかけ，後脚を台上に降ろし

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

Observation items	Suppressive behavior			Normal	Excitement 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	Excitement 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	Jumping up and down
Abnormal position	Difficulty maintenance	Instability position	Inclines a little	Normal position			
Muscle tone	Insensibility	Weak	A little weak	Moderate resistance	A little strong	Strong	Rigor
Straus tail reaction				No reaction	A little	A lot 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			

て2本足で立たせたまま、動かない秒数を計時した。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。

7. 実験動物の取り扱い

6. に記述した試験

は、東京都健康安全研究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

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

Observation items	Suppressive behavior			Normal	Excitement behavior		
	−3	−2	−1		+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	While close	Close a half	Close a little	Normal opening	Open a little	Open a half	While 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 redness

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日日本学術会議）、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、東京都健康安全研究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。

8. ガス回収装置中の成分分析 曝露装置に、溶媒を入れた2本のガス回収装置を接続し燃焼により生じる薬物を捕集した。1本目のガス回収装置にはアセトニトリル、2本目にはジメチルスルホキシドを各々20 mL 入れ、曝露装置を経た気体を通液させた。曝露後のガス回収装置中のアセトニトリルは60°Cの水浴中で減圧濃縮し、ジメチルスルホキシドは60°Cの恒温で真空式ボルテックス濃縮機（バイオクロマト、藤沢）により濃縮した。濃縮後の残留物に5 mLのアセトニトリルを正確に加え、超音波を照射して残留物を溶解した。この一部を0.2 µmのフィルターでろ過し機器分析用試料溶液とした。

機器分析はフォトダイオードアレイ検出器付液体クロマトグラフィー（LC/PDA）、電子イオン化質量分析計付ガスクロマトグラフィー（GC/EI-MS）

により行った。LC/PDA 条件：機器，ACQUITY UPLC PDA system（日本ウォーターズ，東京）；カラム，ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm（50 mm×2.1 mm i.d.，日本ウォーターズ，東京）；カラム温度，40°C；溶離液 A，0.1%ギ酸水；溶離液 B，0.1%ギ酸含有アセトニトリル；グラジエント条件，0→0.50 分，溶離液 A/B=99/1，0.50–6.85 分，同 99/1→10/90，6.85–8.85 分，同 10/90→1/99；流量，0.6 mL/分；注入量，1 µL；測定波長，200–400 nm；データ解析，Empower 2（日本ウォーターズ，東京）。GC/EI-MS の条件：機器，7890A/5975C（アジレント・テクノロジー，八王子）。カラム及びカラム温度，HP-5MS（30 m×0.25 mm i.d.，膜厚 0.25 µm，アジレント・テクノロジー，八王子），50°C（1 分）→10°C/分→325°C（10 分）；キャリアーガス，He；ガス流量，1 mL/分；注入法，スプリット（スプリット比 10：1）又はスプリットレス；注入口温度，250°C；注入量，1 µL；イオン化法，EI 法；イオン化電圧，70 eV；トランスファーライン温度，250°C；四重極温度，150°C；イオン源温度，250°C；データ解析，ChemStation（アジレント・テクノロジー，八王子）。なお使用した試薬は HPLC 用又は LC/MS 用を用いた。

9. カンナビノイド受容体に対するアゴニスト活性 カンナビノイド受容体に対するアゴニスト活

性は、積水メディカル株式会社に委託して実施した。クロンレセプター (Cannabinoid CB₁, Cannabinoid CB₂) は市販のレセプター (HTS019M 及び HTS020M2, Eurofins, Luxembourg) を標品として用い、陽性物質として CP55940 (C-1112, Sigma-Aldrich, St. Louis) を、トレーサーには ³⁵S-GTPγS (NEG030H, PerkinElmer Life & Analytical Sciences, Waltham) を用いた。

陽性物質及び被験物質 1-2 は、いずれもジメチルスルホキシドで溶解・希釈し、 1×10^{-10} – 1×10^{-3} mol/L の 10 倍連続希釈溶液を調製し、さらに各濃度の溶液を超純水で 10 倍希釈し、最終濃度の 10 倍濃度溶液を調製した。陽性物質の 1×10^{-5} mol/L は、100% 反応溶液としても使用した。測定数は、総結合算出に 2 連、100% 反応量算出に 4 連、陽性物質及び被験物質の反応量算出に 2 連とし、それぞれ異なる日に 2 回測定した。

総結合算出用チューブに 10% ジメチルスルホキシド、100% 反応量算出チューブに 100% 反応溶液、陽性物質及び被験物質の反応量算出チューブに陽性物質溶液あるいは被験物質溶液を各 50 μL 添加し、20 mmol/L HEPES-NaOH (pH 7.4) を 100 μL、トレーサー溶液を 100 μL、GDP 溶液を 50 μL、レセプター溶液を 200 μL 添加し、30°C で 60 分間インキュベート後、セルハーベスター (M-30R, BRANDEL, Gaithersburg) によりろ過 (GF/C, Whatman, Maidstone, PBS 処理) し、氷冷した PBS 3 mL で 3 回洗浄後、ろ紙を測定バイアル瓶に移して液体シンチレーター (PICO-FLUOR PLUS, PerkinElmer Life & Analytical Sciences, Waltham) 5 mL を添加し、液体シンチレーションカウンター (2500 型及び 3100 型, PerkinElmer Life & Analytical Sciences, Waltham) で 2 分間測定した。

反応率は、以下の式から算出した。

$$\text{反応率} : [(B - B_0) / (B_{\max} - B_0)] \times 100 (\%)$$

B : 陽性物質・被験物質存在下での反応放射能量 (個別値)

B₀ : 陽性物質・被験物質非存在下での反応放射能量 (平均値)

B_{max} : 最大反応溶液 (アゴニスト溶液) 存在下での反応放射能量 (平均値)

陽性物質及び被験物質の 2 測定の反応率が、反応率平均値の ±10% 以内の場合に測定値を採用した。

この条件を満たさない場合は、陽性物質及び被験物質すべての再測定を実施し、基準を満たした場合の再測定値を採用した。

陽性物質及び被験物質のレセプターに対する最大反応の 50% を示す濃度 (EC₅₀ 値) を算出し、アゴニスト活性を評価した。EC₅₀ 値は、以下のロジスティックモデルによる非線形回帰の結果から推定した。

$$Y = 0 + 1 / [1 + 10^{(-\beta \times (X - ED0.5))}]$$

$$Y \text{ (反応量比)} : (B - B_0) / (B_{\max} - B_0)$$

ED0.5 : EC₅₀ の常用対数

β : 傾き (Hill 係数)

X : 陽性物質・被験物質濃度の常用対数

結 果

1. 行動及び中枢・自律神経症状観察 Tables 4-6 に、陰性対照のマーシュマロウリーフ又は「総統」を燃焼した煙を曝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。着火から燃え尽きるまでの燃焼時間は、マーシュマロウリーフで 1 分 55 秒、「総統」で 1 分 5 秒であった。

1-1. 行動観察 「総統」曝露群では、曝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、呼吸が荒く瞼を閉じてぐったりと網壁にもたれ掛かる様子がみられた (Fig. 3)。

陰性対照群では、曝露開始後に一部の動物が網壁をよじ登ったが、飛び跳ねはみられなかった。さらに曝露を続けると動きが鈍くなり、瞼を閉じて静止する状態がみられた。しかし、「総統」曝露群でみられた脱力感や、体勢の傾きはほとんど認められなかった (Fig. 4)。

曝露後 15 分の観察時には、陰性対照群、「総統」曝露群ともに、洗顔運動が強く抑制されていた。この反応は、陰性対照群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」曝露群では 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、陰性対照群においても認められたが、その作用強度は「総統」曝露群よりも弱く、特に 1 時間の観察時では「総統」曝露群において強い抑制が認められたが、陰性対照群では作用が減弱していた。さらに、「総

Table 4. Mean Value of the Score in General Behavior

Observation items										
Group	Observation time (h)	Aggressiveness	Passivity	Stereotypy	Grooming	Vocalization	Sound response	Touch response	Pain response	Verticalness
Marsh-mallow ^a	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 ^b	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

Strength level of the biological effect 0≤mean value≤0.4: Nothing
0.6≤mean value≤0.8: Uncertain
1.0≤mean value≤3.0: Certain

^a Marshmallow is negative control. ^b SOUTOU contains AB-CHMINACA 2 mg and 5F-AMB 13 mg.

Table 5-1. Mean Value of the Score in Neurological Behavior

Observation items									
Group	Observation time (h)	Spontaneous activity	Abnormal gait	Abnormal position	Muscle tone	Straus tail reaction	Righting reflex	Pinna reflex	Corneal reflex
Marsh-mallow ^a	0.25	-0.8	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	-0.2	0	0	0	0	0	-0.2	0
	1	-0.2	0	0	0	0	0	-0.4	0
SOUTOU ^b	0.25	-2.0	-3.0	-3.0	-2.0	0	-2.6	-2.2	-2.0
	0.5	-1.8	-2.2	-1.6	-1.6	0.8	-2.2	-1.0	-1.2
	1	-1.4	-1.8	-1.4	-1.4	0.8	-1.0	-0.2	-0.8

^a Marshmallow is negative control. ^b SOUTOU contains AB-CHMINACA 2 mg and 5F-AMB 13 mg.

Table 5-2. Mean Value of the Score in Neurological Behavior

Observation items						
Group	Observation time (h)	Tendon reflex	Tremor	Convulsion	Grip strength	Detached finger
Marshmallow ^a	0.25	0	0	0	0	0
	0.5	-0.6	0	0	0.4	0
	1	0.2	0	0	0	0
SOUTOU ^b	0.25	-2.0	0	0	-2.6	0
	0.5	-1.0	0	0	-1.6	-0.6
	1	-0.8	0	0	-1.0	-1.0

Strength level of the biological effect 0≤mean value≤0.4: Nothing
0.6≤mean value≤0.8: Uncertain
1.0≤mean value≤3.0: Certain

^a Marshmallow is negative control. ^b SOUTOU contains AB-CHMINACA 2 mg and 5F-AMB 13 mg.

統」曝露群においては、消極性、外界反応、触反応及び痛反応の抑制と、攻撃性及び反復動作の亢進が認められた (Table 4)。

1-2. 中枢神経症状観察 曝露後 15 分の観察時には、陰性対照群、「総統」曝露群ともに自発運

動が抑制されたが、その作用強度は陰性対照群では弱かった。この反応の抑制は、陰性対照群では 30 分の観察時以降はほとんど消失したが、「総統」曝露群では 1 時間の観察時まで継続して認められた。さらに、「総統」曝露群では、曝露後 15 分の観察時

Table 6. 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
Marsh-mallow ^a	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 ^b	0.25	0.4	-2.8	0	0	0	-1.0	-1.0	0	-3.0	0
	0.5	0	-0.2	0	0.6	0	-1.6	-1.6	0	-3.0	0
	1	-0.4	0.6	0	0	0	-1.4	-1.4	0	-3.0	0

Strength level of the biological effect 0≤mean value≤0.4: Nothing
0.6≤mean value≤0.8: Uncertain
1.0≤mean value≤3.0: Certain

^a Marshmallow is negative control. ^b SOUTOU contains AB-CHMINACA 2 mg and 5F-AMB 13 mg.

Fig. 3. SOUTOU Smoke Exposed Mice

Fig. 4. Marshmallow Smoke Exposed Mice

から異常歩行, 異常姿勢, 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, これらの反応は時間の経過とともに減弱した

Table 7. Catalepsy Test

	Observation time (h)	Marsh-mallow (Negative control)	SOUTOU (AB-CHMINACA 2 mg, 5F-AMB 13 mg)
Number of positive animals	0.25	0	2
	0.5	0	2
	1	0	1

$n=5$.

が, 1時間の観察時まで継続して認められた。また, 30分の観察時以降に挙尾反応及び指間離開が観察された (Tables 5-1 and 5-2)。

1-3. 自律神経症状観察 曝露後15分の観察時には, 陰性対照群, 「総統」曝露群ともに, 眼裂及び体温に抑制の影響がみられた。陰性対照群における体温の低下 (平均 2.3℃) は, 「総統」曝露群での体温低下 (平均 3.5℃) よりも作用強度が弱く, 眼裂の抑制も陰性対照群において作用強度が弱かった。陰性対照群では, 曝露後30分の観察時以降, 体温の低下 (30分後平均 1.8℃, 1時間後平均 0.7℃) 以外の反応はほとんど消失した。「総統」曝露群では, さらに呼吸数及び心拍数の抑制がみられ, 呼吸数及び心拍数の抑制と体温低下が曝露後1時間の観察時まで同程度の作用強度で続いた。体温は曝露後15分で平均 3.5℃, 30分で 5.2℃, 1時間で 5.9℃低下した。眼裂は30分後に抑制作用がほとんど消失し, 1時間後にはやや亢進が認められた (Table 6)。

2. カタレプシー試験 カタレプシー試験結果を Table 7 に示した。陰性対照群では, 曝露後15

Fig. 5. Liquid Chromatograms with a UV Detection at 275 nm of Marshmallow (A, B), SOUTOU (C, D), 5F-AMB (E) and AB-CHMINACA (F) with Combustion Experiment

Fig. 6. Total Ion Chromatograms Recorded by the GC-MS for the Marshmallow (A, B), SOUTOU (C, D), 5F-AMB (E) and AB-CHMINACA (F) with Combustion Experiment

Table 8. Response Rate (%) and Mean EC₅₀ (mol/L) of ³⁵S-GTPγS Binding of Test Substances on Cannabinoid CB₁ (Human) and Cannabinoid CB₂ (Human) Receptors

Substance	Cannabinoid CB ₁ (Human)		Cannabinoid CB ₂ (Human)	
	Response rate ^a (%)	Mean EC ₅₀ (mol/L)	Response rate ^a (%)	Mean EC ₅₀ (mol/L)
AB-CHMINACA	100.00, 100.00	2.26×10^{-10}	100.00, 100.00	1.52×10^{-10}
5F-AMB	100.00, 100.00	4.23×10^{-10}	100.00, 98.91	5.45×10^{-10}
CP55940	100.00, 100.00	4.17×10^{-10}	100.00, 100.00	2.72×10^{-10}

^a Substance concentration (1×10^{-5}). Response rates are expressed as the mean values of duplicate samples.

分, 30 分及び 1 時間において, すべて陰性であった。「総統」曝露群では, 曝露後 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。

3. ガス回収瓶中の薬物成分分析 LC/PDA と GC/EI-MS による分析の結果, **1-2** はいずれも, 燃焼による分解は確認できず, 未変化体のまま気化し, 薬物として作用することが明らかとなった (Figs. 5 and 6). また 2 本目のガス回収装置でも薬物が検出されたことから, 気化した成分は 1 本目のガス回収装置ですべて捕集できるわけではないことが判明した。

4. カンナビノイド受容体に対するアゴニスト活性 陽性物質 (CP55940) 及び被験物質 **1-2** のヒトカンナビノイド受容体 (CB₁ 及び CB₂) に対する反応率及びアゴニスト活性 (EC₅₀ 値) を Table 8 に示した。陽性物質の CB₁, CB₂ に対する EC₅₀ 値は, それぞれ 4.17×10^{-10} , 2.72×10^{-10} であった。**1-2** の CB₁ に対する 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, **1-2** とも陽性物質と同等の強いアゴニスト活性を持つことが明らかになった。

考 察

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ことから, 危険ドラッグ吸入曝露試験における行動観察及び中枢・自律神経症状観察等は, 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群においても, 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, 「総統」曝露群では, 燃焼終了後 15 分から

極めて多くの観察項目において, 強い作用強度での影響が現れ, 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。陰性対照群と「総統」曝露群の両方で影響のみられた観察項目の作用強度を比較すると, 燃焼終了後 15 分の眼瞼下垂を除き, 「総統」曝露群の方がより作用強度が強かった。

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; THC) を実験動物に投与すると, 体温低下,⁶⁻⁸⁾ 自発運動量の低下,⁷⁾ 鎮痛⁷⁾ (すなわち痛反応の抑制), 除脈⁷⁾ (すなわち心拍数の低下), 攻撃行動⁶⁾ (すなわち攻撃性の亢進), カタレプシー⁶⁻⁸⁾を引き起こすことが知られている。「総統」曝露群において, 体温低下 (曝露 1 時間後に平均 5.9°C), 自発運動量の低下 (Table 5-1), 痛反応の抑制 (Table 4), 心拍数の低下 (Table 6), 攻撃性の亢進 (Table 4), カタレプシー (Table 7) がみられたことから, 本吸入曝露試験によりカンナビノイドに特徴的な薬理作用を確認できると考えられた。

ヒトカンナビノイド受容体 (CB₁ 及び CB₂) に対するアゴニスト活性 (EC₅₀ 値) は, **1-2** とも陽性物質と同等レベルの強さを示し, 「総統」曝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みられた強い作用を裏付けた。

煙中の薬物を捕える方法としてガス回収装置を用いたが, その溶媒として, 合成カンナビノイドは有機溶媒に溶け易い性質を有するため, 1 本目のガス回収装置にはアセトニトリルを使用し, 2 本目のガス回収装置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回収液として使用した。燃焼に伴う薬物の変化は, 支持植物の燃焼に由来する成分 (ネガティブコントロール (マーシュマロウリーフのみ) との比較により検証することができると考えられた。現在ま

でに多数の合成カンナビノイドが、東京都内で流通していた実態がわれわれの調査で確認されており、⁹⁻¹⁶⁾ それらの一部についてはカンナビノイド受容体に対するアゴニスト活性は高いと報告してきた。^{15,16)} また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、^{17,18)} 深刻な社会現象となっている。

今回は「総統」に含まれる **1** 及び **2** の薬物について検証したが、今後、化学構造が異なる合成カンナビノイドにおいても、本法を用いれば燃焼に伴う薬物の変化を検証できると考えられる。

これらの結果から、マーシュマロウリーフを陰性対照として用い、曝露後 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できる本吸入曝露試験は、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る。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Fukumori N., Ando H., Kubo Y., Yuzawa K., Nagasawa A., Takahashi H., Yano N., Fuwa T., Ogata A., Uehara S., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **58**, 293–297 (2007).
- 2) Fukumori N., Ando H., Kubo Y., Yuzawa K., Nagasawa A., Takahashi H., Yano N., Huwa T., Oohashi N., Ogata A., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **59**, 329–334 (2008).
- 3) Satoh K., Fukumori N., Fuwa T., Tanaka T., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **60**, 21–35 (2009).
- 4) Ogata A., Satoh K., Fuwa T., Tanaka T., Nagasawa A., Yuzawa K., Yano N., Ando H., Kubo Y., Takahashi H., Ohya K., Miyazawa M., Kojima T., *Yakugaku Zasshi*, **133**, 25–29 (2013).
- 5) Irwin S., *Psychopharmacologia* (Berl.), **13**, 222–257 (1968).
- 6) Inoue T., “Ranyou yakubutsu no kagaku,” Tokyo Kagakudojin Co., Ltd., Tokyo, 2003, pp. 83–84.
- 7) Waku K., *Yakugaku Zasshi*, **126**, 67–81 (2006).
- 8) Yamamoto I., *Bulletin of Hokuriku University*, **24**, 1–23 (2000).
- 9) Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Suzuki J., *Forensic. Toxicol.*, **29**, 51–55 (2011).
- 10) Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Kanai C., Suzuki J., Yoshida M., Hamano T., *Forensic. Toxicol.*, **29**, 95–110 (2011).
- 11) Nakajima J., Takahashi M., Nonaka R., Seto T., Suzuki J., Yoshida M., Kanai C., Hamano T., *Forensic. Toxicol.*, **29**, 132–141 (2011).
- 12) Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Yoshida M., Kanai C., Suzuki J., Hamano T., *Forensic. Toxicol.*, **30**, 33–44 (2012).
- 13) Nakajima J., Takahashi M., Seto T., Kanai C., Suzuki J., Yoshida M., Uemura N., Hamano T., *Forensic. Toxicol.*, **31**, 76–85 (2013).
- 14) Uemura N., Fukaya H., Kanai C., Yoshida M., Nakajima J., Takahashi M., Suzuki J., Moriyasu T., Nakae D., *Forensic. Toxicol.*, **32**, 45–50 (2014).
- 15) Nakajima J., Takahashi M., Uemura N., Seto T., Fukaya H., Suzuki J., Yoshida M., Kusano M., Nakayama H., Zaitzu K., Ishii A., Moriyasu T., Nakae D., *Forensic. Toxicol.*, **33**, 84–92 (2015).
- 16) Ichikawa Y., Nakajima J., Takahashi M., Uemura N., Yoshida M., Suzuki A., Suzuki J., Nakae D., Moriyasu T., Hosaka M., *Forensic. Toxicol.*, **35**, 146–152 (2017).
- 17) European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, “European Drug Report 2016: Trends and Developments,” May 2016: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2637/TDAT16001ENN.pdf>, cited 17 March, 2017.
- 18) United Nations Office on Drugs and Crime “World Drug Report 2016.”: http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf, cited 17 March, 2017.