

図4. 単純反復配列を利用したPCRによる大麻の（品）種識別
M; マーカー, X; メキシコ産, T; トチギシロ, N; ネガティブコントロール

分担研究課題 法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長
研究協力者 宮坂一善 東北厚生局麻薬取締部 鑑定官

大麻 DNA 上の THCAS 遺伝子の塩基配列の調査

研究要旨 違法ドラッグ市場で大麻様の効果を標榜する製品が数多く流通している。その中には大麻の剛毛に酷似した組織を有するものや大麻の簡易試験試薬と反応して偽陽性反応を呈するものがある。大麻の鑑別法である剛毛確認や簡易試験が適さないものが散見されることから、tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS) をコードする遺伝子を標的とする鑑定試験法及び新規の簡易試験試薬を開発するため、THCAS 遺伝子の塩基配列を詳細に調査した。その結果、THCAS 遺伝子を PCR 法により増幅して検出するという鑑定試験法を確立するには複数のプライマーを設定する必要があることが判明した。また、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) プライマーの設定に適した相同性が高い領域が判明したので、LAMP 試薬を用いた新規の簡易試験試薬の開発が可能であると考えられた。

研究協力者
緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬
部主任研究官

A. 研究目的

大麻取締法における大麻は「大麻草及びその製品をいう。ただし、大麻草の成熟した茎及びその製品（樹脂を除く。）並びに大麻草の種子及びその製品を除く。」と定義されている。この大麻を鑑定する場合、麻薬及び向精神薬取締法で規制されている化合物と判別する必要があるため、大麻成分の同定と併せて植物学的な特徴のひとつである大麻の剛毛を確認している。近年、ハーブ製品等と称され、大麻様の精神活性を有する合成化合物が添加された乾

燥植物碎片が違法ドラッグ市場で流通している。これらは一見すると大麻と見間違えるものであり、さらに、その植物細片から大麻の剛毛に酷似した組織が確認されることもある。また、大麻の簡易試験試薬と反応して偽陽性反応を呈するものがあり、捜索現場ではこれを大麻と誤判定した誤認逮捕が相次いでいる。このように、大麻の鑑定においては剛毛確認という手法が適さない事例が散見されており、現場試験においては剛毛確認と簡易試験を併用しても誤認逮捕を回避できないおそれがあることから、新たな試験方法を検討する必要がある。

大麻成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol acid (Δ^9 -THCA) 等のカンナビノイドはモ

ノテルペンとアルキルレゾルシノール(酸)がカップリングした基本骨格を有する低分子有機化合物である。なお、 Δ^9 -THCAの脱炭酸したものが Δ^9 -tetrahydrocannabinolである。25万種を超えるといわれる既知植物の中でカンナビノイドを生合成するものは大麻草だけである。この Δ^9 -THCAはcannabigerol acidのテルペン部がtetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS)により酸化的に閉環されることにより生合成される¹⁾。このTHCASをコードする遺伝子 (THCAS) は他の動植物のDNA上から未だ発見されていないため、大麻に固有のものと考えられる。

本研究では、THCAS遺伝子をPCR法で増幅して検出するという鑑定試験法の確立及び同遺伝子をLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法²⁾で増幅して検出する簡易試験試薬の開発のため、THCAS遺伝子の塩基配列を詳細に調査した。

B. 研究方法

1. 試料

関東信越厚生局麻薬取締部から研究目的で譲り受けた国庫帰属品の大麻 95 検体 (乾燥大麻 94 検体, 樹脂 1 検体), その中に混在していた大麻種子 5 検体及び (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターより譲り受けたトチギシロの種子 9 検体を実験に用いた。

2. 実験方法

乾燥大麻については複数の組織片が混合しないような一組織 10~30 mg を, 樹脂については 10mg を, 種子についてはそのまま 1 粒を採取した。樹脂を除き, エタノールで洗浄し, 風乾してから用いた。試料について各々液体窒素で凍結し, MM-300 (QIAGEN) を用いて粉碎した後,

Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を取扱説明書通り用いて genomic DNA を抽出し, 回収 DNA 溶液各 50 μ L 中の 2 μ L (増幅効率の悪いものについては適宜増量し, 最大 5 μ L) を PCR 反応に用いた。なお, DNA 抽出の成否は葉緑体 DNA 上の ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) 遺伝子の PCR 増幅産物の有無で判定した。プライマーの配列は既報^{3,4)}に従った (THCAS forward primer, 5'-TGA AGA AAA AAA ATG AAT TGC TCA GCA TTT TCC-3'; THCAS reverse primer, 5'-TCT ATT TAA AGA TAA TTA ATG ATG ATG CGG TGG-3'; *rbcL* forward primer, 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC-3'; *rbcL* reverse primer, 5'-GCA GCA GCT AGT TCC GGG CTC CA-3')。反応溶液は酵素 Ex Taq HS (TAKARA) 0.2 μ L, プライマー (2 μ M) 各 2 μ L, 全量 20 μ L に調製した。PCR 反応は次の条件で行った (THCAS, 95°C 2min; 95°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 2min, 35cycles; 72°C 10min, *rbcL*: 95°C 2min; 94°C 30sec, 50°C 30sec, 72°C 2min, 30cycles; 72°C 10min)。PCR 産物を PEG 沈殿または ExoSAP It (usb) 処理後, ダイレクトシーケンスにより PCR 産物の塩基配列を決定した。Cycle Sequence 反応には, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を用い, 解析には ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を使用した。なお, 一部のシーケンス解析については外部委託 (グライナー・ジャパン) した。THCAS 遺伝子の全長 1635 bp の内, 111bp から 1500bp までの 1390bp について, 既報の Accession No. (Acc. No.) AB057805

(九州大学のグループが JBC に報告した drug type の大麻) 等と比較調査した。

C. 研究結果

1. *rbcL* 遺伝子の増幅

国庫帰属品の大麻から抽出した DNA については 95 検体中 92 検体で、種子から抽出した DNA については全て増幅産物が確認された。増幅産物が確認できなかった試料は、樹皮らしきもの、炭化したような状態のもの、樹脂の 3 検体であった。

2. *THCAS* 遺伝子の増幅

rbcL 遺伝子の増幅産物が確認された大麻から抽出した DNA については 92 検体中 75 検体で、大麻種子から抽出した DNA については全て増幅産物が確認された。トチギシロの種子から抽出した DNA については 9 検体中 1 検体でのみ増幅産物が確認された。

3. 塩基配列解析

THCAS 遺伝子の増幅産物が確認された大麻 75 検体中 20 検体及びトチギシロの種子 1 検体については全長にわたってシーケンス波形が乱れ、複数の遺伝子の混在を示唆する結果となり、解析不能であった。残る大麻 55 検体及び大麻種子 5 検体については、一部検体でプライマーのアニーリング部位の下流領域でシーケンス波形が乱れて解析が困難なものがあつたが、111bp から 1500bp までの 1390bp は解析可能であつた。解析の結果、大麻 55 検体及び大麻種子 5 検体の塩基配列は既報³⁾のアサの“drug type”の遺伝子 (Acc. No. AB212834) 又は“fiber type”の遺伝子 (Acc. No. AB212836) あるいはそれらのハイブリッドと高い相同性を示し

たが、互いに 100%の相同性を示すものは存在しなかつた。

Acc. No. AB057805 中の *THCAS* をコードしている部位 1635bp の塩基配列とともに、上記 60 検体の塩基配列とを比較し、置換等の変異が認められた 98 箇所 (98/1390, 7%) を図 1 に示した。なお、その検体数が 1 から 5 検体の塩基 (26 箇所) を Bold 体で示し、6 検体以上の塩基 (72 箇所) をスクエアで囲んで示した。各トリプレットにおける変異箇所の内訳は第 1 塩基が 28, 第 2 塩基が 35, 第 3 塩基が 35 であつた。文字飾りのない塩基は 60 検体全てが完全に一致した (1292/1390, 93%) 。

変異が認められた 98 箇所について、Acc. No. AB057805 と同じ塩基であつた検体を Type 1 とし、異なる塩基であつた検体を Type 2 とし、Type 1 及び 2 の両方の塩基が認められたヘテロ型のものを Type 3 として分類し、その検体数及び変異後の塩基を表 1 に示した。Type 2 となるものが最も多い塩基位置は 117bp 及び 118bp であり、何れも 32 検体 (53%) であつた。Type 3 となるものが最も多い塩基位置は 1079bp で、27 検体 (45%) であつた。また、Type 2 及び 3 の合計が最も多い塩基位置は 885bp で、36 検体 (60%) であつた。なお、終止コドンとして転写される変異は認められなかつた。

D. 考察

鑑定の対象となる国内で押収される大麻の殆どが各国から密輸入されたものか、輸入した種子から栽培されたものであるため、遺伝的変化が多岐にわたることが予想されるが、大麻 (草) の DNA 上に存在する固有の遺伝子を PCR 法等で増幅して確認

することができれば、剛毛確認よりも特異性が高く、極めて高感度な鑑定が可能になる。国内で乱用されている大麻に関する遺伝子の情報は皆無に等しいので、今回特異性が高いと考えられる *THCAS* 遺伝子を標的とし、その遺伝情報を収集した。

今回国内で押収された大麻、そこに混入していた大麻種子及び品種登録されているトチギシロの種子を試料とした。通常の乾燥大麻や大麻種子であれば市販の DNA 抽出キットで容易に抽出可能であったが、*rbcL* 遺伝子の増幅産物が確認されなかった樹皮らしきものや炭化したもの、大麻樹脂については抽出方法を再検討する必要がある。また、*rbcL* 遺伝子の増幅産物が確認されたにもかかわらず、*THCAS* 遺伝子の増幅産物が認められなかったもの（大麻 17 検体及びトチギシロの種子 8 検体）があった。国庫帰属品はその保管状況は不明であり、増幅を阻害する因子が混入した可能性は否定できないが、トチギシロを除く大麻種子から抽出した DNA のいずれについても増幅産物が認められたことから、増幅産物が認められなかった検体はプライマーが機能しなかったものと考えられる。さらに、*THCAS* 遺伝子の増幅産物の認められた大麻 20 検体とトチギシロの種子 1 検体については、複数の遺伝子の混在を示唆するシークエンス波形となり、解析不能であった。国庫帰属品については、極力一塊の組織片を採取するように努めたにもかかわらず、他の大麻に由来する組織の混入が防げなかった可能性があるが、トチギシロの種子で解析した塩基配列の一部に *cannabidiolic acid synthase* をコードする遺伝子に相同性を示す部位が認められたことから、他の組織の混入ではなく、

プライマーのミスアニーリングにより別の遺伝子を増幅したものと考えられる。今回の調査の結果、現在報告されているプライマーは一部の大麻に対応しないことが判明したため、*THCAS* 遺伝子を標的とする DNA 解析の手法を鑑定に導入するには、新たなプライマーを追加設定する必要がある。具体的には、nested PCR 法としても利用できるように現在のプライマーペアの内側に別のプライマーを設定することなどが考えられる。あるいは、*THCAS* 遺伝子を二分して各々にプライマーを設定し、multiplex PCR 法を行うことも考えられる。いずれの方法にしても、今回解析に至らなかったもの（大麻 37 検体及びトチギシロ 9 検体）に適用できなければ、別の遺伝子を標的として検討する必要がある。

塩基配列を解析したもの（大麻 55 検体及び大麻種子 5 検体）と Acc. No. AB057805 の配列を比較したところ、1390bp の内 98 箇所に変異が確認され、“drug type”と“fiber type”の配列に分かれる部位、これらの“hetero type”（各 type と hetero type のキメラも含まれるものと考えられる）となる部位、一塩基置換のある部位が確認された。解析した領域の 7% で変異が確認されたことから、*THCAS* 遺伝子は変異頻度の高い遺伝子であることが判明した。この変異頻度の高さを考慮すると、上述のプライマーが機能しなかった検体についてはアニーリング部位に何らかの変異があることが示唆される。一方、今回の調査で 506~611bp 間の比較的長い領域で 100% の相同性が確認された。この領域に LAMP プライマー（FIP, BIP, LoopF 及び LoopB）を設定し、この領域の外側（上流及び下流）で相同性の

高い部位に別の LAMP プライマー (F3 及び B3) を設定することができれば、LAMP 法による遺伝子増幅が可能になると考えられる。LAMP プライマーについては現在最適な条件を検討中であるが、大麻や大麻種子を水中で直接破碎した懸濁液を LAMP 試薬に加えて 60℃で 5 分間反応させることにより増幅産物の確認が可能であった (data not shown)。なお、PCR 法と同様に一部の検体で増幅が認められないものもあるので改良の余地が残るが、複雑な抽出操作を必要とせず、5 分間で判定可能となるので簡易試験試薬として十分に利用できるものと考えられる。

以上のとおり、THCAS 遺伝子を標的として大麻の鑑定を行うには、既報の PCR 用プライマー単独では不十分であることが判明したので、新たなプライマーを設定する必要がある。また、LAMP プライマーの設定に適する領域が判明したので、LAMP 試薬を現場試験試薬として利用できるものと考えられる。

E. 参考文献

- 1) Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y. and Mechoulam, R., "The Gene Controlling Marijuana Psychoactivity" *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9766-9767 (1995) .
- 2) Eiken GENOME SITE:
<http://loopamp.eiken.co.jp/>
- 3) Kojoma, M., Seki, H., Yoshida, S., Muranaka, T. "DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L." *Forensic Science International* **159**, 132-140 (2006) .
- 4) Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M., Iwatsuki, K. "rbcL gene

sequences provide evidence for the evolutionary lineages" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 5730-5734 (1994) .

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

なし。

学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図 1 Acc.No.AB057805 の *THCAS* 遺伝子の塩基配列及び 111~1500bp で変異が認められた領域

```

1 ATGaatgctcagcattttccttttggttt gtttgcaaaataatatttttctttctctca
61 ttccatatccaaatttcaatagctaatacct cgagaaaacttcccttaaag

111 ctt ctc aaa a
121 cat att cc aac aat gta gca aat cca aaa ctc gta tac act caa cac gac caa ttg tat
181 atg tct atc ctg aat tgc aca ata caa aat ctt aga ttc atc tct gat aca acc cca aaa
241 cca ctc gtt att gtc act cct tca aat aac tcc cat atc ca ga act att tta tgc tct
301 aag aaa gtt ggc ttg cag att cga act cga agc ggt ggc cat gat gct gag ggt atg tcc
361 tac a tct caa gtc cca ttt gtt gta gta gac ttg aga aac atg cat tcg atc aaa ata
421 gat gtt cat agc caa act gcg tgg gtt gaa gcc gga gct acc ctt gga gaa gtt tat tat
481 tgg atc aat gag aag aat gag aat ctt agt ttt cct ggt ggg tat tgc cct act gtt ggc
541 gta ggt gga cac ttt agt gga gga ggc tat gga gca ttg atg cga aat tat ggc ctt gog
601 gct gat aat att att gat gca cac tta gtc aat gtt gat gga aaa gtt cta gat cga aaa
661 tcc atg gga gaa gat cg ttt tgg got ata cgt ggt ggt gga gga gaa aac ttt gga atc
721 att gca gca tgg aaa atc aaa ctg gtt gct gtc cca tca aag tct act ata ttc agt gtt
781 aaa aag aac atg gag ata cat ggg ctt gtc aag tta ttt aac aaa tgg caa aat att gct
841 tac aag tat gac aaa gat tta gta ctc atg act cac ttc ata aca aag aat att aca gat
901 aat cat ggg aag aat aag act aca gta cat ggt tac ttc tct tca att ttt cat ggt gga
961 gtg gat agt cta gtc gac ttg atg aac aag agc ttt cct gag ttg ggt att aaa aaa act
1021 gat tgc aaa gaa ttt agc tgg att gat aca acc atc ttc tac agt ggt gtt gta aat ttt
1081 aac act gct att ttt aaa aag gaa att ttg ctt gat aga tca gct ggg aag aag acg gct
1141 ttc tca att aag tta gac tat gtt aag aaa cca att cc gaa act gca atg gtc aaa att
1201 ttg gaa aaa tta tat gaa gaa gat gta gga gct ggg atg tat gtg ttg tac cct tac ggt
1261 ggt ata atg gag gag att tca gaa tca gca att cca ttc cct cat cga gct gga ata atg
1321 tat gaa ctt tgg tac act gct tcc tgg gag aag caa gaa gat aat gaa aag cat ata aac
1381 tgg gtt cga agt gtt tat aat ttt acg act cct tat gtg tcc caa aat cca aga ttg gog
1441 tat ctc aat tat agg gac ctt gat tta gga aaa act aat cat gcg agt cct aat aat tac

1500
1501 acacaagcacgtatttggggtgaaaagtat tttggtaaaaattttaacaggttagttaag
1561 gtgaaaactaaagttgatcccaataatttt ttagaaaacgaacaaagtatcccaccttt
1621 ccaccgcatcatcatTAA

```

※ a, t, c, g, **a**, **t**, **c**, **g**: 変異が認められた箇所

表1 解析した60検体で変異が認められた98箇所の配列結果

塩基位置 (bp)	117	118	121	129	136	137	142	151	154	167	187	190	194	204
塩基	A	A	C	C	G	T	A	C	G	A	A	C	A	A
Type 1の検体数	28	28	28	31	31	28	59	28	31	59	25	45	46	57
Type 2の検体数 置換後の塩基	32 (G)	32 (G)	30 (T)	20 (T)	18 (C)	24 (C)	1 (G)	29 (T)	12 (A)	1 (T)	28 (G)	—	—	3 (G)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	—	—	2 (Y)	9 (Y)	11 (S)	8 (Y)	—	3 (Y)	17 (R)	—	7 (R)	15 (S)	14 (R)	—

塩基位置 (bp)	221	232	268	269	282	285	287	292	294	300	312	355	366	373
塩基	T	A	A	A	A	A	C	T	A	T	C	A	A	G
Type 1の検体数	28	59	28	28	28	28	28	25	28	28	27	28	44	49
Type 2の検体数 置換後の塩基	28 (C)	1 (G)	31 (G)	31 (T)	30 (G)	31 (C)	31 (G)	25 (C)	28 (C)	26 (C)	28 (T)	26 (T)	9 (T)	7 (C)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	4 (Y)	—	1 (R)	1 (W)	2 (R)	1 (M)	1 (S)	10 (Y)	4 (M)	6 (Y)	5 (Y)	6 (W)	7 (W)	4 (S)

塩基位置 (bp)	380	383	385	409	412	418	424	474	494	505	612	631	678	684
塩基	T	T	G	T	A	A	G	T	A	C	T	A	G	G
Type 1の検体数	59	28	28	28	27	28	37	56	28	27	27	59	28	59
Type 2の検体数 置換後の塩基	1 (C)	14 (C)	27 (A)	26 (A)	31 (G)	29 (G)	16 (A)	4 (G)	31 (T)	24 (T)	27, 1 (C, G)	1 (T)	25 (A)	1 (T)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	—	18 (Y)	5 (R)	6 (W)	2 (R)	3 (R)	7 (R)	—	1 (W)	9 (Y)	5 (Y)	—	7 (R)	—

塩基位置 (bp)	699	735	744	749	763	800	803	818	831	862	864	869	881	882
塩基	T	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	T	T	A
Type 1の検体数	28	58	31	27	26	59	59	59	58	28	27	27	35	59
Type 2の検体数 置換後の塩基	31 (A)	2 (C)	14 (T)	20 (T)	24 (G)	1 (T)	1 (A)	1 (G)	2 (C)	20 (A)	25 (G)	25 (C)	8 (G)	1 (G)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	1 (W)	—	15 (K)	13 (Y)	10 (K)	—	—	—	—	12 (R)	8 (R)	8 (Y)	17 (K)	—

塩基位置 (bp)	885	887	892	893	894	898	908	911	945	953	975	1035	1079	1080
塩基	A	A	A	T	T	G	G	A	A	A	C	T	T	T
Type 1の検体数	22	28	54	59	52	46	53	52	29	31	30	29	27	26
Type 2の検体数 置換後の塩基	22 (T)	15 (G)	1 (G)	1 (C)	—	1 (C)	2 (T)	—	25 (C)	15 (T)	8 (T)	20 (G)	6 (A)	22 (C)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	14 (W)	16 (R)	5 (R)	—	8 (Y)	13 (S)	5 (K)	8 (M)	6 (M)	14 (W)	22 (Y)	11 (K)	27 (W)	12 (Y)

塩基位置 (bp)	1092	1112	1147	1172	1176	1179	1208	1210	1222	1224	1232	1268	1272	1287
塩基	T	T	A	C	T	A	A	T	G	T	C	T	G	A
Type 1の検体数	48	53	54	31	34	26	59	59	59	39	29	55	31	59
Type 2の検体数 置換後の塩基	1 (G)	—	1 (C)	23 (T)	15 (A)	25 (T)	1 (G)	1 (C)	1 (C)	12 (G)	9 (T)	4 (G)	22 (T)	1 (C)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	11 (K)	7 (W)	5 (M)	6 (Y)	11 (W)	9 (W)	—	—	—	9 (K)	22 (Y)	1 (K)	7 (K)	—

塩基位置 (bp)	1289	1322	1329	1334	1340	1342	1361	1365	1395	1397	1404	1407	1481	1484
塩基	C	A	T	A	C	T	A	T	T	A	T	G	A	C
Type 1の検体数	59	55	48	57	56	45	58	27	48	59	30	29	27	27
Type 2の検体数 置換後の塩基	1 (T)	4 (G)	9 (C)	3 (C)	4 (T)	7 (A)	2 (C)	24, 1 (C, G)	7, 1 (A, C)	1 (C)	21 (C)	23 (A)	23 (C)	24 (A)
Type 3の検体数 ヘテロ型の塩基	—	1 (R)	3 (Y)	—	—	8 (W)	—	8 (Y)	4 (W)	—	9 (Y)	8 (R)	10 (M)	9 (M)

※ ヘテロ型の塩基 : M; A and C, Y; C and T, S; C and G, R; A and G, W; A and T, K; T and G.

分担研究課題 法規制薬物（植物を含む）の分析と鑑別に関する研究
研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

違法薬物の中樞神経作用の高感度検出系としての報酬系を利用した
学習実験の有用性に関する研究
研究協力者 関野祐子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 部長

研究要旨 違法薬物の中樞神経系に対する抑制や興奮の作用の蓋然性の判定に、報酬系を利用した新しい視覚弁別学習試験が有用であるかについて検討をおこなった。12時間の飲水制限をした成熟雄 C57BL6 マウスを用いて、10%コンデンスミルクを報酬とした視覚弁別学習を行った。タッチスクリーンにランダムに映し出される画像を口あるいは前肢でタッチする事によって報酬が得られるトレーニングを1週間行ったところ、すべての個体で学習が成立することが確認できた。学習が成立したマウスに、向精神薬の1種であるNMDA型グルタミン酸受容体阻害薬のMK-801（0.1 mg/kg および 0.3 mg/kg）、覚せい剤の一種であるメタンフェタミン（1 mg/kg）、カンナビノイド作用薬である WIN55212-2（1 mg/kg）を投与し学習成立後の正答率への影響を検証した。MK-801（0.3 mg/kg）では、行動量が増加して正答率が低下した。メタンフェタミンでは、行動量が低下して正答率が低下した。WIN55212-2 では鎮静効果により行動に時間がかかるようになるものの正答率は変わらなかった。本研究に用いた新しい視覚弁別学習試験は、単に正答率の変化を検証するのみならず薬物によって誘発される行動様式の変化も調べることができ、中樞神経系に対する抑制や興奮の作用の蓋然性の判定には有用な方法であるといえる。

研究協力者 児島伸彦 群馬大学大学院医学
系研究科生命医科学専攻神経薬理学 准教授

A.研究目的

中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚の作用により人体の保健衛生上の危害が発生するおそれのある化合物を指定薬物として薬事法において取り締まりの対象とするためには、中樞神経系作用の蓋然性を示す科学的根拠の迅速な提出が求められる。従来これらの科学的根拠は、受容体との結合実験かいくつかの行動薬理実験により提出されてきた。受容体結合実験は、化合物の構造から作用する受容体が想定

されていないとはならず、まずは脱法ドラッグからの薬物の抽出、構造解析、合成を行う必要があるために、中樞神経作用の蓋然性を示すまでに時間を要する。一方行動薬理実験は、化合物の構造が不明でも動物に投与して行動解析を行うことで中樞神経作用の蓋然性を観察できるというメリットがあり、行動薬理実験による迅速な評価が期待される場所である。しかし、現在用いられている行動薬理実験は、薬物選択試験、薬物弁別試験、薬物自己投与実験、条件付け場所嗜好性試験などであり、薬物依存性形成の可能性を評価する試験法¹⁾である。

薬物の依存性形成を評価するこれらの試験法では、薬物により快情動が誘発されなければ試験が成立しないため、快情動以外の中枢神経薬理作用を見逃す恐れがある。また動物が自発的に薬物を摂取する試験法（薬物選択試験、薬物弁別試験、薬物自己投与実験）では、動物の薬物摂取量の制御が難しいために、摂取量が有効量に達していない場合には検出不可能である。さらに自己投与実験は、薬物の精神依存性を評価する実験として信頼性が高いとされているが、この実験を行うためにまず、実験者によるカテーテル留置法の習得、動物のレバー押し訓練、レバー押しによりカテーテルから注入される薬液の量・速度の調整など、実験手技そのものの獲得に時間と熟練を要する。このために現在、この実験法により薬物の依存性を評価出来る技術者の数が少なくなっており、汎用性が低くなっているのが難点である。最後に、条件付け場所嗜好性実験であるが、実験操作が比較的簡便で、短期間での依存性評価が可能であり広く使用されている²⁾。この試験法では、真ん中仕切られた箱のどちらの側で薬物を投与して、動物が薬物の投与側に滞在する時間が延長するか短縮するかを評価する。しかしこの試験は、薬物に対する嗜好性の判定であって、脳の認知機能に影響のある薬物への評価は難しい。

このように、現在一般的に指定薬物指定のために用いられている科学的根拠となっている行動実験に関しては様々な点から見直しが必要であると考え。指定薬物に指定するためには、新規の脱法ドラッグの薬物依存性の有無を信頼度高く評価することよりも、より迅速に感度良く中枢神経系に対する興奮や抑制の作用を蓋然性についての科学的根拠を提出することが重要である。麻薬取締行政からみると、より迅速に中枢神経系への作用について検出できる行動薬理実験系を確立する必要がある。

現在の行動薬理実験は、1960年代に向精神薬が開発されるに伴い急速に発展した行動薬理学により成立したものである。近年の脳科学の急速な進歩により、さまざまな遺伝子改変マウスが作製され、迅速な行動解析により、脳の構成タンパク分子と行動の関連を迫る研究が非常に多くなされることとなった。そのような脳科学の発展を背景に、一昨年イギリスケンブリッジ大学で、マウス用にタッチスクリーン認識学習装置を用いた視覚弁別試験を組み合わせた新しい報酬学習実験が開発された。視覚弁別学習を行うためのタッチスクリーンが搭載された学習装置（Bussey-Saksida型チェンバー）と、完成度の高い学習プログラムが市場に登場した^{3) 4)}。あらかじめマウスのハンドリングと訓練が必要で学習の成立に時間がかかるが、特に熟練を要する実験手技はなく、非常に再現性良く学習が成立する学習プログラムである。Bussey-Saksida型チェンバーを用いるこの学習プログラムを用いてスコポリミンによる記憶障害モデルに対するドネペジル効果が評価されており、高次脳機能評価に有用であることが報告されている⁵⁾。

本研究では、既存の中枢神経作用薬を用いてこの新規学習プログラムが薬物の中枢神経性の作用の検出に有用であるかを検討した。視覚弁別学習が成立したマウスに、向精神薬の1種であるNMDA型グルタミン酸受容体阻害薬のMK-801（0.1 mg/kg および 0.3 mg/kg）、覚せい剤の一種であるメタンフェタミン（1 mg/kg）、カンナビノイド作用薬であるWIN55212-2（1 mg/kg）を投与して、学習成立後の正答率への影響を検証した。

B. 研究方法

実験は、群馬大学大学院医学系研究科生命医学専攻基礎医学系神経薬理学の実験室で行われた。日本クレアで購入した9週令C57BL/6N雄マウスを用いた。飼育環境は室温 23±1℃、

湿度 50±10%、明暗各 12 時間（照明時間：6 時～18 時）で、1 ケージ当たり 5 匹の群で飼育した。餌（日本クレア CE-2）・水は自由摂取の条件下で購入後 1 週間の馴致期間を経て、12-14 時間の給水制限を開始した。

（倫理面の配慮）

動物実験は、群馬大学「動物実験に関する指針」を順守し、群馬大学動物管理者の協力を得て、動物福祉、愛護の精神に基づいて、適切な実験計画と実験手技により実施した。動物実験計画は、群馬大学実験動物委員会により承認されている。

トレーニングスケジュール

トレーニング開始前

報酬の効果を得るために、トレーニングの 3 日前よりマイルドな給水制限を施す。トレーニング開始の少なくとも 12 時間前に給水瓶を抜き取り給水制限し、トレーニング後には給水瓶を戻して自由に水を摂取させる。

1 日目: チェンバー（図 1）への慣らし
動物をチェンバー内に 10 分間放置する。トレーを 10% コンデンスミルク（報酬）で満たしておき、トレーに報酬があることに気付かせる。
2 日目: チェンバーへの慣らしの二日目
動物をチェンバー内に 20 分間放置する。はじめに少し大目（150 μl）の報酬をとるためにトレーに鼻を突っ込むこと（nose-poking）により、セッションがスタートする。次に、ブザー音とともにトレー内に照明が点灯し報酬が出る（7 μl）。次の報酬が出るまでの時間間隔（ITI: intertrial interval）は 10 秒である。このトレーニングによって動物はブザー音とトレー内の照明が報酬の出る合図であることを学習する。

3-7 日目: 音と報酬の関係を学習する。

動物をチェンバー内に 40 分間放置する。それ以外は上記の慣れ二日目と同じである。

動物がチェンバー内にいる 40 分間に出る報酬（最大効率では 10 秒ごとに報酬が出るので、6 回/分×40 分=240 回となるが通常はこれ以下である）を全て取得したら学習成立とする。通常、5 日間のトレーニングで報酬の取得数は横ばいとなるが、さらに 2 日間トレーニングを行う。

8 日目: タッチスクリーンに画像が出たら触ることで報酬を得ることを学習する。

30 分間もしくは 30 トライアル行う。2 つの画面のうち一方にランダムに画像が 30 秒間提示される。それをタッチ（鼻面か前肢で）すれば、正答音とともにトレーに報酬（7x3=21 μl）が出る。動物が報酬をとり、20 秒後に別の画像が出る。しかしこのトレーニングでは画像をタッチしなくても 10 秒後に画像が消え音とともにトレーに報酬（7x1=7 μl）が出る。動物はより多くの報酬を得るため画面に画像が出たらタッチする事を学ぶ。

9-13 日目: 難易度アップ: 画像にタッチしないと報酬がもらえないことを学習する。

30 分間もしくは 20 トライアルを行う。動物が画像をタッチしなくては決してトレーから報酬（7 μl）が出ないこと以外は、上記と同じである。画像をタッチしない、もしくはブランクの（画像のない）画面をタッチしても罰はない。動物は画面上の画像をタッチしなければ報酬が得られない事を学ぶ。動物が 30 分以内に 80% の正答率で 20 トライアルを行えば学習成立と判断する。

14-15 日目: 誤解答への罰則を設ける。

60 分間もしくは 30 トライアルを行う。画像をタッチしない、もしくは画像のない画面をタッチすると部屋の照明が 5 秒間点灯する（罰）。（注: 明るくなることはマウスにとっては恐怖である。）

16-20 日目: 視覚弁別学習

60 分間もしくは 30 トライアルを行う。2 画面に 2 種類の画像（一方は正答、他方は不正答）

が同時に提示され、正答の画像をタッチすれば、正答音とともにトレーに報酬 (7 μ l) が出る。動物が報酬をとり、ITI (20 秒) 以降に再びトレーに nose-poking すると再び画像が出る。不正答の画像をタッチするとチェンバー内の照明が 5 秒間点灯し、報酬は出ない。動物が、60 分以内に 80% の正答率で 30 トライアルを行えば学習成立と判断する。

21 日目以降：視覚弁別学習の成立したマウス

に対する 薬物投与実験の開始

弁別テストの 15 分前に以下の薬物を腹腔内投与する。

- 1) MK-801 0.1 mg/kg (MK0.1)
- 2) MK-801 0.3 mg/kg (MK0.3)
- 3) メタンフェタミン (METH) 1 mg/kg (この投与を 2 回くり返した。)
- 4) WIN 55,212-2 (WIN) 1 mg/kg

各薬物の投与の翌日には、薬物を投与せず、あるいは生理食塩水を投与して弁別テストを実施し、薬物の効果からの回復をみた。

C. 研究結果

図 2 に、視覚弁別学習成立後の動物に対する各種薬物の作用を示した。テストは 1 日に 1 回の試行を行った。図 1 A は、30 トライアル中の正答回数 B は、30 トライアル完了までにかかった時間 C は、トレーへのアクセス回数である。薬物の効果の観察したところ、下記のようなになる。また、表 1 には薬物の効果をまとめた。

- 1) MK-801 0.1 mg/kg

変化なし

- 2) MK-801 0.3 mg/kg

過活動、常同行動が顕著 (ビーム通過回数に反映) であった。正答率が低下し、30 トライアル完了までに要した時間が延長した。タッチ回数は変化しなかったがトレーへのアクセス回数が増えた。

MK-801 は高濃度 (0.3 mg/kg) で典型的な hyperlocomotion、stereotypies を誘発する。

これらによって弁別タスクの実行が妨げられているようにみえるが、音に反応してトレーに向かう条件反応はある程度保持されているようにみえた。

- 3) メタンフェタミン 1 mg/kg

正答率が低下し、30 トライアル完了までに要した時間が延長した。9 匹中 3 匹は制限時間 (60 分) 以内に 30 トライアル完了できなかった。ビーム通過、トレーへのアクセス回数に変化はなかったが、スクリーンのタッチ回数は減少した (2 回目の投与時にさらに減少)。

メタンフェタミンの初回投与で行動量は減少し、動物はチェンバーの隅でじっとしていることが多かった (くり返し投与すると徐々に行動量が上がることが報告されている)。

- 4) WIN 55,212-2 1 mg/kg

正答率、タッチ回数、トレーへのアクセス回数には変化がなかった。鎮静効果が顕著で、ビーム通過回数が減少し、30 トライアル完了までの時間が延長した。

カンナビノイド受容体アゴニストの鎮静作用で動きは低下するが、それにより時間はかかるが正答率は必ずしも低下しなかった。

各薬物投与の次の試行では何も投与せず、あるいは生理食塩水を投与して行った結果、動物の正答率、30 トライアル完了時間はもとのレベルに回復しており、各薬物の単回投与の影響が一過性である事が分かった。

D. 考察

本研究で用いたタッチスクリーンを用いた視覚刺激の弁別学習装置は、刺激や報酬がコンピュータにあらかじめプログラムされたスケジュールによって全自動で提示され、かつスクリーンタッチやトレーへの nose-poking をはじめとする動物の行動も時系列に従って記録してくれるものである。そのプログラムに従えば特に経験と熟練を要せずにマウスを効率良く視覚弁別の学習を獲得させる事ができる。いったん学習を獲得した動物に対して中枢神経作用薬を投与することで、その正答率への効果のみならず、それぞれの薬物に応じて特徴のある行動様式の変化を観察できることが分かった。薬物の1回投与で行動変化が観察されるが、翌日には行動や正答率が回復しており、同一個体を利用して、濃度の異なる薬物投与や、薬物の種類を変えて効果を確認出来ることが判明した。あらかじめ学習を成立させたマウスを用意しておくことで、迅速に薬物の中枢神経作用を検出することが可能である。また、トレーニング前に薬物を投与することで、慣れの成立への影響を調べることができる。もしも慣れの成立に要する日数が、向精神薬、麻薬、覚せい剤などにより影響されれば、必ずしも視覚弁別学習の成立を待つ必要はなく、中枢神経作用をさらに迅速かつ簡便に検証できる試験法となる。

E. 参考文献

- 1) 廣中直行 (2010) 報酬探索行動の神経機構とその病態解明に向けた課題 実践行動薬理学 p.253 日本薬理学会編集 金芳堂
- 2) 船田正彦、青尾直也 (2007) 薬物依存性の評価法—条件付け場所嗜好性試験を中心に— 日薬理誌 130,128-133
- 3) Bussey TJ, Padain TL, Skillings EA, Winters BD, Morton AJ, Saksida LM (2008) “The touchscreen cognitive testing method for rodents: how to get the best out of your rat.” *Learn Mem* 15:516-23

4)

http://www.shoshinem.com/p4_web_catalogue/80416Busseyflier09.pdf

- 5) Bartko SJ, Vendrell I, Saksida LM, Bussey TJ (2011) “A computer-automated touchscreen paired-associates learning (PAL) task for mice: impairments following administration of scopolamine or dicyclomine and improvements following donepezil.” *Psychopharmacology (Berl)* 214:537-548

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表 なし

学会発表 なし

表 1

薬物の効果のまとめ

	所用時間	ビーム通過回数	正答率 (%)	タッチ回数	トレーへのアクセス回数
MK0.1	—	—	—	—	—
MK0.3	↑	↑	↓	—	↑
METH 1 回目	↑	—	↓	↓	—
METH 2 回目	↑	—	↓	↓↓	—
WIN	↑	↓	—	—	—

—は非投与時と比べて変化なし。

A. Outside view of two chambers B. Inside view



C. Touch screen

D. Food tray

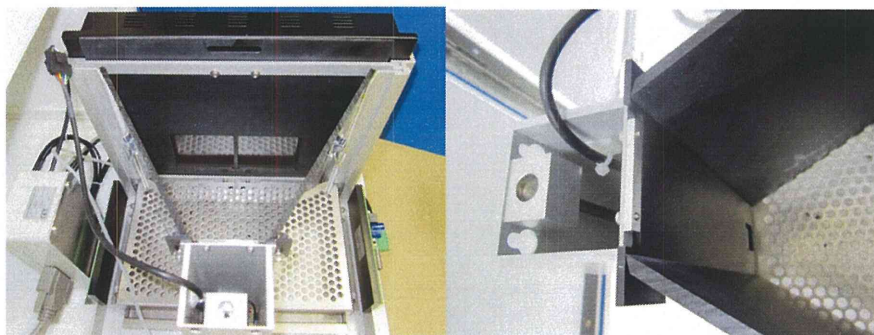


図 1 : Bussey-Sakside 型チェンバー

A.外観 B.チャンバー内の構造（全体）

C. タッチスクリーン 左右の窓に図形がうつるようになっている。

D. フードトレイ（コンデンスミルクが出るトレイ）

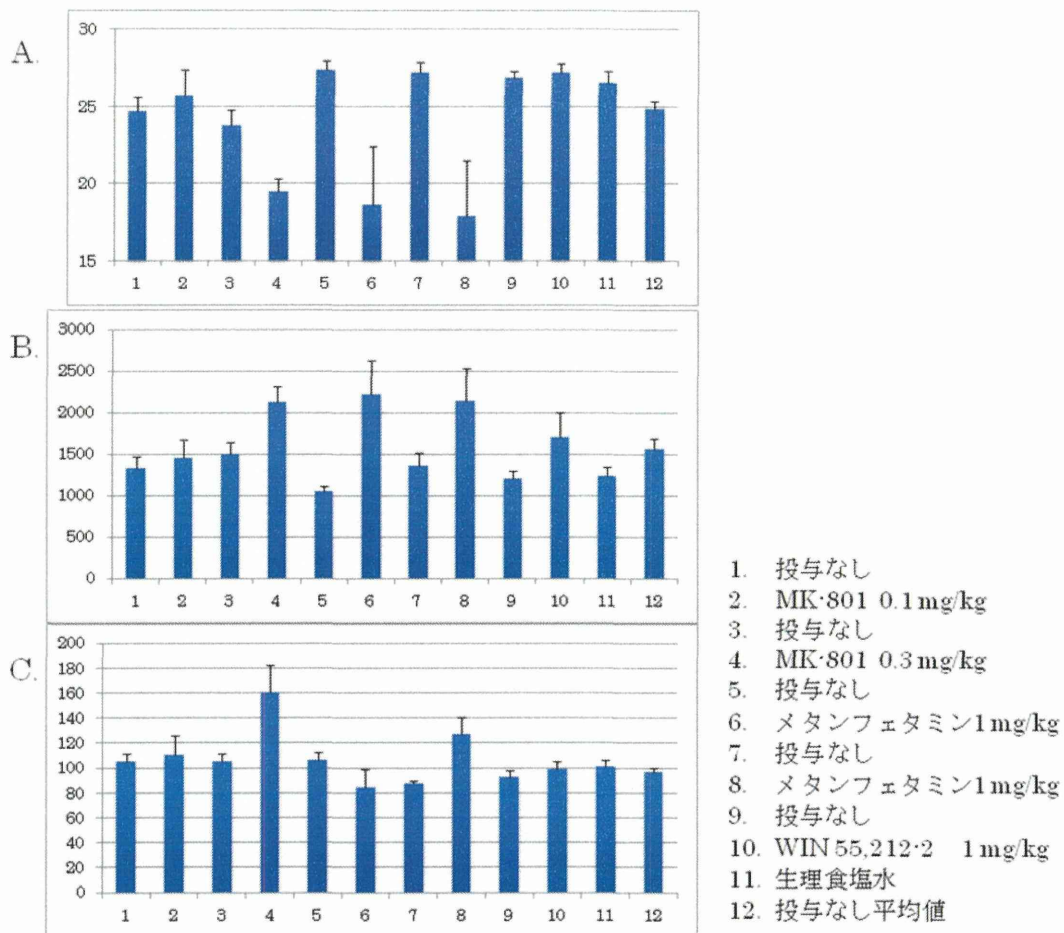


図 2 : 視覚弁別学習成立後の動物に対する各種薬物の作用

A. 30 トライアル中の正答回数 B. 30 トライアル完了までにかかった時間 (秒) C. トレーへのアクセス回数

横軸は、薬物投与実験開始後の試行回数 (最低 24 時間間隔) を示している。12 番は 1,3,5,7,9 の薬物投与なし平均値である。A. 投薬の次のテストでは正答回数が投与なしレベルに戻った。4:MK-801 (0.3 mg/kg)投与、6,8:メタンフェタミン(1 mg/kg)投与により正答回数が減少した。10:WIN 55,212-2 (1 mg/kg)投与では正答回数は低下しなかった。B. 正答回数が減った 4,6,8,10 で、トライアル完了までの時間がかかっている。10 では正答回数が変わらなかった。C. 4,8 でトレーへのアクセス数が増えており、過活動となっていることが分かる。

分担研究報告書

分担研究課題 法規制薬物の分析と鑑別に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

分担研究者 花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

日本国内で押収された大麻の形態観察及び THC 含有量調査

研究協力者 阿久津 守 関東信越厚生局麻薬取締部 鑑定課長

研究要旨 世界各国において、嗜好目的で流通する大麻製品中の精神作用成分 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (THC) の含有量が増加しているとの報告があることから、日本国内での実態を把握するために調査を実施した。大麻事犯の裁判が終了して国庫に帰属した証拠品の大麻を対象として形態観察及び THC 等の定量を行った。2010年4月から2011年3月に全国麻薬取締部を経由して地方検察庁から厚生労働大臣に引き継がれた大麻9072検体中、6376検体(286.6kg)が乾燥大麻であった。そのうち検体数で65.2%、重量で73.0%が、いわゆるシンセミアの可能性のある種のない花穂であった。1g以上の乾燥大麻1115検体を分析した結果、THCの酸化生成物であるカンナビノール(CBN)の含有量が高いものも多く、保存中にTHCが減少していると考えられた。そこで、比較的新鮮と考えられるCBN/THCが0.1以下のものについて集計した結果、種のない花穂(335検体)のTHC含有量平均値は11.2%、最大値は22.6%であった。この値は諸外国で「高まった」とされるTHC含有量に匹敵しており、高THC含有大麻の流通実態がわが国にもあると考えられた。

研究協力者（所属は調査実施時のもの）

青木力也 北海道厚生局麻薬取締部 鑑定官

時枝良夫 東北厚生局麻薬取締部 鑑定官（現・近畿鑑定官）

川瀬泰治 関東信越厚生局麻薬取締部横浜分室 鑑定官（現・小倉分室情報官）

片岡 正 東海北陸厚生局麻薬取締部 鑑定課長

高木敏之 近畿厚生局麻薬取締部 鑑定課長

津村ゆかり 近畿厚生局麻薬取締部神戸分室 鑑定官

水野智海 中国四国厚生局麻薬取締部 鑑定官

深田真功 四国厚生支局麻薬取締部 鑑定官

藤井広志 九州厚生局麻薬取締部 鑑定課長

倉橋利実 九州厚生局沖縄麻薬取締支所 鑑定官

A. 研究目的

近年、嗜好目的で流通する大麻製品中の精神作用成分 Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(THC)の含有量の増加が、米国¹⁾、英国^{2, 3)}、オランダ⁴⁾、ドイツ⁵⁾、イタリア⁶⁾、ニュージーランド⁷⁾等の各国から報告されている。

大麻製品中の THC 含有量の増加の要因として、品種改良、栽培技術の進展、国内栽培品が増加しユーザーに届くまでの時間が輸入品よりも短縮されたこと等が推定されている⁸⁾。また、より THC 含有量が高い未授精の雌花（いわゆるシンセミア）の比率の増加も観察されている^{1, 9-10)}。国連薬物犯罪事務所(UNODC)は世界薬物報告

2006 で「シンセミアは外見と効力の両面で、一般的な大麻とは別の薬物とみなして当然の違いがある」と述べている¹⁰⁾。

THC 含有量の増加は、大麻使用者の救急搬送事例の増加、あるいは精神障害リスクの増加と関連づけられるとの指摘があり^{5, 9-11)}、健康影響が懸念されている。また、近年諸外国において、薬物の影響下での運転(DUID)が問題となっているが、この原因薬物としても大麻が目されている¹⁰⁾。

我が国において大麻は覚せい剤に次いで検挙者数が多い乱用薬物であり、その乱用は拡大傾向にある。2010年の大麻事犯の検挙者数は2367人であり¹²⁾、10年前(2000年)の1224人¹³⁾に対してほぼ倍増している。また、雌株をクローニングして大規模にシンセミアを生産する室内栽培事犯が近年しばしば摘発されるようになった。

我が国の大麻草中の THC 含有量に関しては1970年に厚生省が実施した調査結果¹⁴⁾があるが、これは正規栽培及び野生の大麻草のものであり、乱用を目的として栽培された大麻に関する調査ではない。

我が国においても不正大麻中の THC 含有量が増加している可能性があることから、その実態を明らかにすることを目的として、押収大麻に関する調査を実施した。UNODC は大麻中 THC 含有量の実態把握における問題点として、分析部位や分析法が明示されないなど分析法が不統一であること、サンプルが当該国(地域)内の平均的な大麻を代表しているか不明であること等を挙げている。そこで本研究においては、UNODC が2009年に刊行した推奨大麻試験法¹⁵⁾を利用して定量を行い、分析用サンプルの採取法についても明確な基準を設けた。

なお、昨年度の報告書において途中経過を報告しているが、この報告書では昨年の報告分も含む全体を報告する。

B. 研究方法

1. 試料

(1) 国庫帰属品

当該事件の裁判が終了して札幌・仙台・東京・横浜・名古屋・大阪・神戸・広島・高松・福岡・那覇の地方検察庁から各地区麻薬取締部を経由して厚生労働大臣に引継がれた証拠品の大麻を調査対象とした。引継量が少なく、分析可能件数に余裕がある場合は、各地区の判断で地検支部からの引継物件も対象とした。

調査期間は2010年4月から2011年3月までの引継分とした。ただし仙台地方検察庁からの引継分については2010年10月から調査を開始し、全数でなく後述する条件で選定した定量用の検体のみを対象とした。

(2) 鑑定嘱託品

鑑定嘱託された大麻の全数について重量または本数の記録及び形態観察を行った。調査期間は2010年6月から2011年3月までとした。ただし東海北陸厚生局麻薬取締部鑑定分については2010年12月から開始した。

2. 試薬・器具

カンナビノイド標準品：THC、カンナビノール(CBN)、カンナビジオール(CBD) 各1mg/mLメタノール溶液(Cerilliant)

内部標準：トリベンジルアミン(TBA) 特級

内部標準溶液：TBA エタノール溶液(0.5mg/mL)

エタノール：99.5% 特級

乳鉢及び乳棒：陶磁器製またはめのう製

フィンガーマッシャー(手もみ式簡易破碎容器)：アシスト AM.79340

ステンレス篩：1mm メッシュ、直径75mm

メンブランフィルター：0.45 μm

ドライバス：150℃まで昇温可能なもの

3. カンナビノイド試験法

(1) 試料液調製

国連薬物犯罪事務所(UNODC)の推奨大麻試験

法¹⁵⁾に沿って次の通り試料液を調製した。

- 1) 乾燥大麻試料を紙の上に広げて茎、枝、葉柄を取り除いた。
- 2) 残り（花と葉）を四分法で減らしていき、0.5～1g程度にした。
- 3) これを乳鉢またはフィンガーマッシャーを用いて粉碎した。フィンガーマッシャーの場合は2～5回程度試料を入れ替えながら行った。
- 4) 粉碎した試料を篩にかけた。
- 5) 篩にかけた試料を正確に200mg秤取して共栓付試験管（20～30mL容）に入れ、ホールピペットを用いて、内部標準溶液20mLを正確に加え、15分間超音波抽出を行った。
- 6) 抽出液をメンブランフィルターでろ過した。
- 7) ろ液を500μL採取して、2mL容GCバイアルへ移し、ドライバスで150℃、12分間加熱して溶媒を乾固させ、THCカルボン酸を脱炭酸させた。
- 8) この残渣にエタノール1.5mLを加え、バイアルをよく攪拌し溶解したものを試料液とした。

検量線用溶液はCBNの標準溶液に内部標準溶液及びエタノールを加えて3.33～533.3μg/mLの濃度としたものであり、乾燥大麻中の含有量として0.1、0.5、1、3、5、10、16%の7段階に相当する。

THC及びCBDの濃度の計算においては、CBNのピークに対する面積値の比を用いた。その際の換算係数はいずれも1とした。また、カットオフ値はすべてについて0.1%（大麻中）とした。

(2) ガスクロマトグラフィー(GC)条件

機器：Agilent 7890 または島津製作所 GC2010

カラム：HP-5 または HP-5MS（30m × 0.25mm, 0.25 μm）、UNODCの推奨法に記載されている15mのものに替えて30mのものを使用

キャリアガス：ヘリウム、1.1mL/min

モード：コンスタントフロー

注入口温度：250℃

オープン温度プログラム：2 min at 200℃、

10℃/min 200-240℃、15 min at 240℃

スプリット比：20:1

検出器：水素炎イオン化検出器(FID) 300℃

検出器ガス条件：水素 35 mL/min, 空気 350 mL/min

4. カンナビノイド標準溶液のGC応答の確認

カンナビノイド標準溶液の各ロットは、入手するつどGCにおける応答を確認した。1 mg/mLの各標準溶液150μLに対して内部標準溶液500μL及びエタノール850μLを加え、これらをGCに注入してピーク面積を相互に比較した。

5. 試験法の確認

関東・近畿・九州の鑑定室において、添加回収試験を実施した。THC及びCBN含有量の低い乾燥大麻試料を用意し、この抽出液に対して1%相当のTHC、CBN、CBDを別々に加え、定量した。

6. 精度管理分析

北海道・東北・関東・東海・近畿・中国・四国・九州の鑑定室において、精度管理分析を実施した。

関東信越厚生局麻薬取締部において国庫帰属乾燥大麻の中から比較的量の多いもの3検体を選び、それぞれ0.5～1cm程度の大きさにハサミでカットした。それをよく混ぜ合わせて均一にし、1gずつに小分けしてポリ袋に封入した。これらを各地区の担当者が持ち帰り、THC等を定量した。

（各3試行×3検体）

7. 形態観察

国庫帰属品・鑑定囑託品とも、目視により国庫帰属品の大麻を「乾燥大麻・全草・樹脂・オイル・その他」に分類した。「その他」とは、タバコやハーブとの混合物、燃焼残渣等である。「乾燥大麻」については、さらに「花穂（種有）・花穂（種無）・葉・枝等」に分類した。

各検体について、添付の引継書に記載されている重量を記録した。全草については重量でなく本数が記載されている場合があり、この場合は本数を記録した。

さらに、鑑定囑託品及び定量対象の国庫帰属品

について、上記の項目に加え、乾燥状態(乾・湿)、生育度(茶色の柱頭の有無)、葉の色(緑色・褐色・中間色)を目視により観察した。

8. カンナビノイドの定量

一部の国庫帰属品について研究用として交付を受けカンナビノイドを定量した。定量用検体は以下の基準で選別し、精度管理分析を行った8鑑定室において定量した。

- 1) 乾燥大麻であること(全草・樹脂・オイルは対象にしない)。
- 2) 引継重量が単品で1g以上のもの。
- 3) 同一起源から小分けされたと考えられる一群の引継品については、そのうちの1つ(単品で1g以上のもの)を任意に選択。
- 4) 一群の引継品がすべて1g未満の場合は、合計重量が1gを超えるように複数個選択。

[同一起源と判断する基準]

- ・内容物及び袋が同じ外観である。
 - ・被疑者名や事件番号情報が付属している場合、それらが一致している。
 - ・引継番号等が連続している。
- 5) 引継重量が1gを大きく超えるもの:1gのみ取り分けて交付を受ける。
 - 6) 2つ以上の部位が混合した試料:1gを大きく超えるもので、混合した試料であった場合
 - ・花穂と葉が混合した試料については花穂を採取する。
 - ・種子のある花穂と種子のない花穂が混合した試料については種子のない花穂を採取する。

C. 研究結果及び考察

1. カンナビノイド標準溶液の濃度及びGC応答の確認

表1は著者らが実験に用いたカンナビノイド標準溶液の各ロットの添付文書に記載されていた「調製濃度」と「実測濃度」、及びGC分析におけるピーク面積比(CBN標準溶液の一つの面積値を1とする)である。

THCは不安定な化合物であり、UNODCの推奨試験法¹⁵⁾ではCBNを標準品としてTHCを定量することを推奨している。Poortman-van der Meerらによれば、GC-FIDにおける応答(面積値)の理論値は、用いる計算モデルによって若干の差があるものの、THC/CBNは0.982~1.00、CBD/CBNは0.97~0.990とされている¹⁶⁾。

試験したロットの中でAのTHCは品質保持期限を過ぎていたため考察の対象外とした。その他のロット、すなわちB、E、Fはいずれも「調製濃度」に基づく理論値の範囲を若干超える面積値を示した。

標準溶液の供給会社は「調製濃度」に基づいて定量計算を行うことを推奨している。しかし、実験結果を「実測濃度」当たりに換算したところ、B、E、Fとも、より理論値に近い値が得られた。その数値は0.995から1.000の範囲であった。

この結果を踏まえ、また、Poortman-van der Meerらの実験結果が理論値と完全な一致をみていない¹⁶⁾ことから、換算係数はTHCについてもCBDについても1とした。また、CBN標準溶液の絶対濃度は供給会社の推奨値である1.000mg/mLを採用した。

CBNを用いる定量には上述の通り微小な不確実さを伴う。しかし、THCは麻薬であるため入手・配布・管理に時間と費用を要すること、CBDの標準溶液も高価であることから、CBNを対照とする定量法はこの調査に適していた。

2. 試験法の検討

(1) CBDとCBCの識別

CBDはカンナビクロメン(CBC)と非常に近い保持時間を示すことが知られている¹⁷⁾。これらのマススペクトルは互いに類似しているが、市販の各種データベースによれば、CBDはm/z 246のピークを与え、CBCは与えないため、両者はガスクロマトグラフ質量分析計によって識別できる。今回調査対象とした検体の大多数からCBCと考えられるピークが検出された。(CBCの標準