

201034043A

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の
発症機序と乱用実態把握に関する研究

課題番号：H21-医薬-一般-031

研究報告書

平成 23 年 3 月

研究代表者：船田正彦

違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発症機序と 乱用実態把握に関する研究

研究代表者 船田正彦

(国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部 依存性薬物研究室長)

【研究要旨】違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として、大麻の精神活性成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)と薬理作用が類似した化合物や覚せい剤と類似構造を有する化合物等の流通と乱用が問題となっている。本研究では、合成カンナビノイド誘導体とフェネチルアミン誘導体 2C シリーズを中心に、身体依存性と神経細胞毒性の発現を評価し、その発現メカニズムに関する基盤研究を行なった。また、違法ドラッグの研究および評価の際の基礎資料を提供する目的で、違法ドラッグを含む薬物乱用実態に関する疫学調査を実施した。**[研究-1：合成カンナビノイドの身体依存性および細胞毒性の評価]**合成カンナビノイドである(-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol (CP-55,940)慢性投与による身体依存形成の有無について評価した。また、退薬症候発現時の脳内モノアミン神経系の変化についても解析した。1) 身体依存性：CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) の慢性投与は 1 日 2 回 5 日間にわたって行なった。6 日目に CP-55,940(1 mg/kg, i.p.)を投与し 4 時間後にカンナビノイド受容体拮抗薬である N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251, 1 mg/kg, i.p.) 投与によって誘発される退薬症候の観察を行なった。AM251 投与により、著しい跳躍行動および身震い行動の発現が確認された。2) 脳内モノアミンに対する影響：AM251 誘発退薬症候の観察後、大脳皮質を分画し HPLC 法に従ってノルアドレナリンおよび代謝産物である 3-methoxy-4-hydroxyphenyl-ethyleneglycol (MHPG) の含量を測定した。CP-55,940 慢性処置動物では、AM251 の投与によりノルアドレナリンおよび MHPG の有意な増加が認められた。CP-55,940 慢性処置により身体依存が形成され、急激な作用の遮断により激しい退薬症候が誘発されることが明らかになった。また、退薬症候の発現において、脳内ノルアドレナリン神経系の過剰興奮が一部関与する可能性が示唆された。カンナビノイド誘導体の身体依存性を推測する生化学的マーカーとして、AM251 誘発の脳内のノルアドレナリンおよびノルアドレナリン代謝産物含量の増加が利用できると思われる。3) 細胞毒性：NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を使用し、CP-55,940 処置による細胞毒性を評価したところ、濃度依存的に細胞毒性の発現が確認された。本研究より、CP-55,940 などの合成カンナビノイド誘導体は身体依存形成能を有することが明らかになった。また、細胞に対して毒性を示す危険性も有すると考えられる。合成カンナビノイド誘導体の慢性処置後、カンナビノイド受容体拮抗薬誘発による退薬症候の観察により、身体依存形成能を評価できることが明らかになった。また、合成カンナビノイド誘導体の細胞毒性は、NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を利用することで、効率良く評価できることが確認された。**[研究-2：合成カンナビノイドの薬物弁別刺激特性：カンナビノイド受容体の役割]**薬物弁別実験：CP-55,940 と生理食塩液の薬物弁別を獲得した動物において、麻薬である Δ^9 -THC は CP-55,940 と般化が認め

られた。カンナビノイド受容体拮抗薬併用の効果を検討したところ、CP-55,940 の弁別刺激効果の発現は、CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により抑制された。一方、CB2 受容体拮抗薬 AM630 では CP-55,940 の弁別刺激効果の抑制は認められなかった。本研究では、合成カンナビノイド CP-55,940 を標準薬とした、薬物弁別動物獲得のための訓練条件を確立した。合成カンナビノイド誘導体は、 Δ^9 -THC と類似の自覚効果（薬理効果）を有しており、その効果発現には CB1 受容体が関与していることが示唆された。CP-55,940 を標準薬（訓練薬）とした薬物弁別試験は、合成カンナビノイド誘導体の依存性評価に有効である。[研究-3：フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討] フェネチルアミン系の違法ドラッグ「2C シリーズ」の 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C) および trichloro-2C-H (T-2C-H) の神経細胞毒性を検討した。薬物をドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞へ添加し、神経細胞毒性ならびに形態学的変化を評価した。また、ミトコンドリアでの活性酸素種生成についても検討した。CATH.a 細胞、B65 細胞のいずれの細胞においても、T-2C-H 単独添加により低濃度から用量依存的な LDH 放出量の著明な増加が認められた。規制薬物のメタンフェタミン(METH)、MDMA やメチロンの毒性(IC50: 1-2 mM 以上)に比べはるかに高度であった。B65 細胞への 24 時間添加においては、T-2C-H は核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を 2C-C よりも比較的低濃度(75~100 μ M)で惹起した。T-2C-H の 2C-C との B65 細胞への併用暴露では、単独では障害性のみられない濃度の T-2C-H (25 μ M)は、2C-C (100~500 μ M)による LDH 放出量の増加ならびにアポトーシス様の形態変化をさらに増強させ、T-2C-H による 2C-C の神経毒性に対する相乗効果がみられた。2C-C、T-2C-H とともに非常に低濃度(50-100 μ M)において、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させた。T-2C-H は、他のフェネチルアミン系の違法ドラッグと同様に、単独でドパミン系神経細胞ならびにセロトニン系神経細胞に対して極めて強い細胞毒性を示すことを明らかにした。現在までの検討から、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」は、MDMA、METH との併用あるいは「2C シリーズ」同士の同時乱用はとくにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に強い神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。T-2C-H および 2C-C はドパミン系神経細胞に対して、T-2C-H はセロトニン系神経細胞に対して極めて強い神経毒性を有すると考えられる。[研究-4：クラブユーザーにおける MDMA 等のクラブドラッグ乱用実態に関する研究] クラブユーザーにおけるクラブドラッグの乱用経験や乱用者の特徴を把握することを目的に、クラブイベントの来場者に対し実態調査を行った。研究協力の得られた 3 店舗のクラブで開催された計 4 回のイベントで、673 枚のエントリーカード（参加券）を配布し、324 名より調査協力を得た（回収率 48.1%）。重複回答者および回答に不備があった者を除く 305 名を分析対象とした。解析の結果、1）対象者となったクラブユーザーの 33.8%は何らかの薬物使用経験を有し、大麻が 32.1%と最も高く、MDMA 7.9%、覚せい剤 6.2%、コカイン 6.2%、有機溶剤 4.6%、ケタミン 3.3%と続いた。諸外国のクラブユーザーに比べれば低い値であるが、国内の一般住民や青少年と比較すると顕著に高い値である。2）MDMA 使用者の特徴として、①30 代男性が中心、②クラブカルチャーとの親和性が高い、③多剤乱用者が多い、④薬物使用に伴うエピソードが豊富、⑤攻撃的行動との合併例が多いことが判明した。3）薬物使用経験者が数多く集まるクラブは、薬物乱用・依存に対する予防介入を効率的に行える場・空間の一つである。

本研究より、CP-55,940 などの合成カンナビノイド誘導体は身体依存形成能を有することが明らかになった。合成カンナビノイド誘導体の慢性処置後、カンナビノイド受容体拮抗薬誘発による退薬症候の観察により、身体依存形成能を評価できることが明らかになった。また、違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイドは、大麻成分である Δ^9 -THC と類似の弁別刺激特性を有することが明らかになった。合成カンナビノイド誘導体において、薬物による中枢作用の発現用量を参

考に慢性投与条件を設定し、拮抗薬誘発による退薬症候観察により身体依存性を評価できることが明らかになった。薬物弁別試験法は、標準となる薬物が示す自覚効果と他の薬物の自覚効果の類似性を評価できることから、合成カンナビノイド誘導体などの数多くの類縁誘導体が存在する違法ドラッグの中枢作用の解析に有用であることが示唆された。また、フェネチルアミン系の違法ドラッグおよび合成カンナビノイド誘導体において、細胞毒性を示すことが明らかとなった。培養細胞を利用した細胞毒性の評価は、薬物単独および規制薬物との併用実験などの様々な環境設定が可能であり、迅速かつ正確な毒性評価法として有用である。本研究の総合評価システムは、違法ドラッグの薬物依存性および神経毒性の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。実態調査の結果から、対象者となったクラブユーザーの 33.8%は何らかの薬物使用経験を有し、大麻が 32.1%と最も高いことが明らかになった。薬物使用経験者が数多く集まるクラブは、薬物乱用・依存に対する予防介入を効率的に行える場・空間の一つである。薬物使用による健康被害に関する正しい情報を提供するとともに、相談援助につなげるような予防介入が必要である。

分担研究者： 船田正彦
 国立精神・神経医療研究センター
 精神保健研究所薬物依存研究部
 依存性薬物研究室長

分担研究者： 富山健一
 国立精神・神経医療研究センター
 精神保健研究所薬物依存研究部
 流動研究員

分担研究者： 浅沼幹人
 岡山大学大学院医歯薬学
 総合研究科脳神経制御学講座
 神経情報学 准教授

分担研究者： 嶋根卓也
 国立精神・神経医療研究センター
 精神保健研究所薬物依存研究部
 心理社会研究室 研究員

A. 研究目的

わが国は、第三次覚せい剤乱用期にあり、種々の規制薬物の乱用の拡大は、大きな社会問題である。若年層では、麻薬として規制されている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)に代表される“クラブ・ドラッグ”

の乱用が浸透しており、深刻な状況である。一方、インターネット等の通信手段の普及により、薬物等の化学物質に関する情報伝播は非常に高速化している。それに伴い、様々な化学物質の取引は容易かつ迅速になり、その入手可能性が高まっている。

近年、法的規制を受けない化学物質で、乱用を目的として売買されている違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の氾濫は、きわめて重大な社会問題となっている。国内で流通が確認されている違法ドラッグとしては、既に麻薬として規制されている 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT)に類似したトリプタミン誘導体および覚せい剤と類似化学構造を有するフェネチルアミン誘導体等が知られている。フェネチルアミン誘導体としては、「2C シリーズ」の 2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C) およびアンフェタミンおよびメタンフェタミンの 4 位が置換された 4-fluoroamphetamine (4FMP) および 4-methoxymethamphetamine (PMMA)等は、覚せい剤類似化合物として、国内における流通が確認されており、その乱用拡大が懸念される化学物質である。

同様に、違法ドラッグとして合成カンナビノイド誘導体は、「スパイス」という呼称で世界的にその乱用が拡大している。スパイスは

カラフルな大きな瞳のロゴが印刷されたパッケージ製品として、天然ハーブ等と称してインターネットや路上販売などにより流通していることが判明している。スパイスは、なんらかの植物の乾燥品に、合成カンナビノイド誘導体を混入させるという偽装を行っているのが特徴である。

現在までに、ドイツや日本において、スパイスシリーズの成分解析が進んでおり、合成カンナビノイド誘導体としては、(-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol (CP-55,940)、5-(1,1-dimethylheptyl)-2-(3-hydroxycyclohexyl) phenol (CP-47,497)および5-(1,1-dimethyloctyl)-2-(3-hydroxy-cyclohexyl)phenol (CP-47,497-C8) (Fig. 1) 等が検出されている。

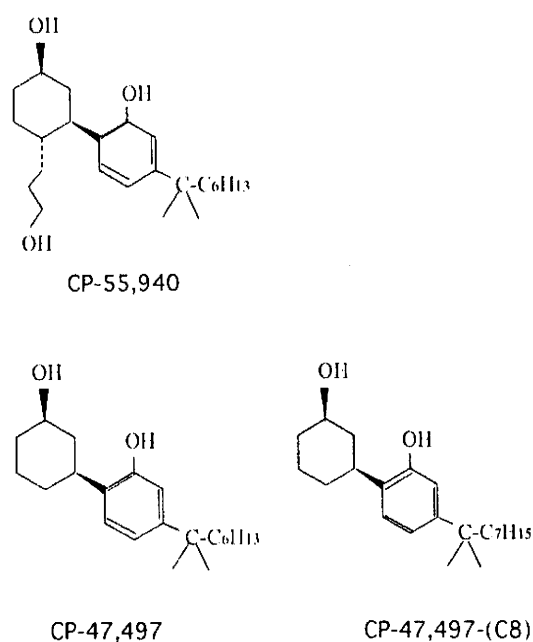


Fig. 1. Chemical structures of synthetic cannabinoids, CP-55,940, CP-47,497 and CP47,497-(C8).

合成カンナビノイド誘導体は、大麻と類似の薬理作用を有する可能性が極めて高い。したがって、薬物の薬物依存性および神経毒性発現の有無を評価する基礎的な検討が必要である。大麻の精神活性成分である Δ^9 -tetra-

hydrocannabinol (Δ^9 -THC)との比較を通じ、違法ドラッグの依存形成の強度と神経毒性について明確にするのは緊急課題である。

合成カンナビノイド誘導体には、数多くの類似構造体が存在するため、迅速に乱用危険性および毒性発現を検出する評価システムの構築が重要である。薬物依存性の解析においては、合成カンナビノイド誘導体である CP-55,940 を標準薬として身体依存形成能の評価を行った。また、多くの類似化合物の中枢作用を、効率良く比較検討するためには、自覚効果の類似性を解析できる薬物弁別実験による評価が必要である。そこで、薬物弁別試験法の有用性を検証した。細胞毒性の評価では、CP-55,940、CP-47,497 およびその側鎖の炭素数が異なる CP-47,497-(C8)について、培養細胞を利用した解析を行なった。以上の研究を通じて、違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイド誘導体に関して、その乱用危険性および毒性発現を検出する評価システムを構築することは、非常に重要である。

一方、違法ドラッグの取締りは強化されている。厚生労働省では「未認可医薬品」、東京都では「知事指定薬」として規制されるケースもあり、乱用防止に貢献している。しかしながら、取締りの強化により、違法ドラッグの流通はアンダーグラウンド化していく傾向があり、その乱用の実態把握はきわめて重要になっている。違法ドラッグに関する乱用実態を把握することは、流通している薬物の情報が収集できるとともに、薬物乱用防止対策の立案、遂行の基礎資料として重要である。

本研究では、合成カンナビノイド誘導体および覚せい剤類似化合物の薬物依存性、自覚効果および神経細胞毒性の発現を評価し、その発現メカニズムに関する基盤研究を行なった。また、違法ドラッグの研究および評価の際の基礎資料を提供する目的で、クラブユーザーを対象に、違法ドラッグを含む薬物乱用実態に関する疫学調査を実施した。

B. 各分担研究の目的、方法、結果

[研究-1: 合成カンナビノイドの身体依存性および細胞毒性の評価]

分担研究者：松田正彦

国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 薬物依存研究部
依存性薬物研究室長

大麻と類似の作用を示す合成カンナビノイド誘導体が、違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として流通しており、その乱用が問題となっている。条件付け場所嗜好性試験等の評価から、大麻及び合成カンナビノイド誘導体は、精神依存形成能を有する危険性が明らかになっている。一方、合成カンナビノイド誘導体の身体依存性については検討がなされていない。本研究では、合成カンナビノイド誘導体である (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol (CP-55,940) に着目して、慢性投与による身体依存形成の有無について評価した。また、退薬症候発現時の脳内モノアミン神経系の変化についても解析した。1) 身体依存性：CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) の慢性投与は1日2回5日間にわたって行なった。6日目にCP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) を投与し4時間後にカンナビノイド CB1 受容体拮抗薬である N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251, 1 mg/kg, i.p.) 投与によって誘発される退薬症候の観察を行なった。その結果、跳躍行動、身震い行動および立ち上がり行動増加などの異常行動の発現が確認された。2) 脳内モノアミンに対する影響：AM251 誘発退薬症候の観察後、大脳皮質を分画し HPLC 法に従ってノルアドレナリンおよび代謝産物の含量を測定した。CP-55,940 慢性処置動物では、AM251 の投与によりノルアドレナリンおよびノルアドレナリン代謝産物である 3-methoxy-4-hydroxy-phenylethylenglycol (MHPG) の有意な増加が認められ

た。CP-55,940 慢性処置により身体依存が形成され、急激な作用の遮断により激しい退薬症候が誘発されることが明らかになった。また、退薬症候の発現において、脳内ノルアドレナリン神経系の過剰興奮が一部関与する可能性が示唆された。カンナビノイド誘導体の身体依存性を推測する生化学的マーカーとして、AM251 誘発の脳内のノルアドレナリンおよびノルアドレナリン代謝産物含量の増加が利用できると考えられる。3) 細胞毒性：NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を使用し、CP-55,940 処置による細胞毒性を評価したところ、濃度依存的に細胞毒性の発現が確認された。本研究より、CP-55,940 などの合成カンナビノイド誘導体は身体依存形成能を有することが明らかになった。また、細胞に対して毒性を示す危険性も有すると考えられる。

[研究-2: 合成カンナビノイドの薬物弁別刺激特性：カンナビノイド受容体の役割]

分担研究者：富山健一

国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 薬物依存研究部
流動研究員

大麻の精神活性成分である (Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) と薬理作用が類似した合成カンナビノイド誘導体が、違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として流通しており、その乱用が問題となっている。本研究では、薬物弁別実験を用いて、合成カンナビノイド誘導体である (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol (CP-55,940) および (6aR,10aR)-3-(1,1-dimethylbutyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzo[b,d]pyran (JWH-133) について、それぞれの薬物弁別刺激効果を解析し、 Δ^9 -THC の効果と比較検討した。また、合成カンナビノイド誘導体の薬理作用は、カンナビノイド受容体を介して起こるものと考えられることから、カンナビノ

イド受容体拮抗薬を併用した薬物弁別刺激効果発現の有無についても検討した。1) CP-55,940 を用いた薬物弁別実験の確立：CP-55,940 (0.1 mg/kg) および溶媒である生理食塩液により、FR10 スケジュールによる弁別訓練を実施した。CP-55,940 により、用量依存的に弁別刺激効果が認められたことから、CP-55,940 を標準薬とした薬物弁別の訓練条件が明らかになった。2) Δ^9 -THC の般化試験：CP-55,940 弁別獲得動物を用いて、 Δ^9 -THC (0.1-3 mg/kg)の般化試験を行った。 Δ^9 -THC は CP-55,940 と般化が認められ、類似の弁別刺激効果を有することが明らかになった。3) 合成カンナビノイド誘導体の般化試験：CP-55,940 弁別獲得動物を用いて、CB1 受容体拮抗薬 AM251 (1 mg/kg)および CB2 受容体拮抗薬 AM630 (1 mg/kg)を前処置した動物に、CP-55,940 (0.1 mg/kg)を投与し般化試験を行った。また、CB2 受容体選択的合成カンナビノイド誘導体 JWH-133 (3 mg/kg) を用いて般化試験を行った。その結果、CB1 受容体拮抗薬 AM251 において CP-55,940 の弁別刺激効果が有意に抑制された。一方で CB2 受容体拮抗薬 AM630 において CP-55,940 の弁別刺激効果の抑制は認められなかった。また、JWH-133 においても CP-55,940 との般化は認められなかった。このことから、合成カンナビノイド誘導体 CP-55,940 は CB1 受容体を介してその効果が発現すると示唆された。合成カンナビノイド誘導体は、 Δ^9 -THC と類似の自覚効果（薬理効果）を示すことから、乱用危険性を有することが確認された。

[研究-3: フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討]

分担研究者：浅沼幹人

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
脳神経制御学講座神経情報学 准教授

フェネチルアミン系の違法ドラッグ「2C シリーズ」のなかでも、指定及び規制を免れ最近広く流通し、乱用されている

2,5-dimethoxy-4-chlorophenethylamine (2C-C) および 2C-C と類似の骨格を有する trichloro-2C-H (T-2C-H)の神経細胞毒性を明らかにする目的で、T-2C-H のドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞への添加を行い、神経細胞毒性ならびに形態学的変化を評価した。また、活性酸素種に対する蛍光指示薬を用いて、暴露早期におけるミトコンドリアでの活性酸素種生成についても検討した。結果：CATH.a 細胞、B65 細胞のいずれの細胞においても、T-2C-H 単独添加により低濃度から用量依存的な LDH 放出量の著明な増加が認められた。この T-2C-H 単独添加 (24 時間) による細胞毒性を他の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C と LDH 放出量の IC50 で比較すると、CATH.a 細胞では 2CT-7 (100 μ M)、T-2C-H (100 μ M) > 2C-C (150 μ M)、2CT-2 (150 μ M)、2CT-4 (200 μ M) > 2C-I (250 μ M)、B65 細胞では T-2C-H (100 μ M) > 2CT-7 (150 μ M)、2C-I (150 μ M) > 2CT-2 (250 μ M) > 2CT-4 (300 μ M)、2C-C (350 μ M)であり、規制薬物のメタンフェタミン(METH)、MDMA やメチロンの毒性(IC50: 1-2 mM 以上)に比べはるかに高度であった。B65 細胞への 24 時間添加においては、T-2C-H は核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を 2C-C よりも比較的低濃度(75~100 μ M)で惹起した。T-2C-H の 2C-C との B65 細胞への併用暴露では、単独では障害性のみられない濃度の T-2C-H (25 μ M)は、2C-C (100~500 μ M) による LDH 放出量の増加ならびにアポトーシス様の形態変化をさらに増強させ、T-2C-H による 2C-C の神経毒性に対する相乗効果がみられた。さらに B65 細胞への添加 3 時間後の早期の検討では、2C-C は 250 μ M 以上で細胞体の萎縮ならびに細胞質内の空胞化を伴う形態変化を示すのに対して、T-2C-H はさらに低濃度(100 μ M)からこれらの変化を惹起した。2C-C、T-2C-H とともに非常に低濃度(50-100 μ M)において、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させた。

[研究-4: クラブユーザーにおける MDMA 等の
クラブドラッグ乱用実態に関する研究]

分担研究者: 嶋根卓也

国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 薬物依存研究部
心理社会研究室 研究員

本研究は、クラブユーザーにおける MDMA 等のクラブドラッグの使用状況を把握し、薬物使用者の心理社会的な特徴を捉えることを目的とした。調査対象者は、平成 22 年 10 月～平成 23 年 2 月までの間に、研究協力の得られた 3 店舗のクラブで開催された計 4 回のイベントの来場者である。イベントの音楽ジャンルは、3 回がレゲエ、1 回がオールジャンルであった。調査方法は、クラブ店舗内にアンケートブースを設営し、ノートパソコンを使った無記名自記式のパソコン調査を行った。総数 673 枚のエントリーカード（参加券）を配布し、324 名より調査協力を得た（回収率 48.1%）。重複回答者および回答に不備があった者を除く 305 名を分析対象とし、以下の知見を得た。1) 対象者となったクラブユーザーの 33.8%は何らかの薬物使用経験を有し、大麻が 32.1%と最も高く、MDMA 7.9%、覚せい剤 6.2%、コカイン 6.2%、有機溶剤 4.6%、ケタミン 3.3%と続いた。諸外国のクラブユーザーに比べれば低い値であるが、国内の一般住民や青少年と比較すると顕著に高い値である。2) MDMA 使用者の特徴は次の 5 点である。①30 代男性が中心、②クラブカルチャーとの親和性が高い、③多剤乱用者が多い、④薬物使用に伴うエピソードが豊富、⑤攻撃的行動との合併例が多い。3) 薬物使用経験者が数多く集まるクラブは、薬物乱用・依存に対する予防介入を効率的に行える場・空間の一つである。薬物使用による健康被害に関する正しい情報を提供するとともに、相談援助につなげるような予防介入が必要である。

C. 考察

1. 合成カンナビノイド誘導体の精神依存性
および細胞毒性の評価

本研究より、CP-55,940 は身体依存形成能を有することが明らかになった。薬物の効果消失による退薬症候の発現には、脳内ノルアドレナリン神経系が関与する可能性が示唆された。合成カンナビノイド誘導体の慢性処置後、カンナビノイド受容体拮抗薬誘発による退薬症候の観察により、身体依存形成能を評価できることが明らかになった。合成カンナビノイド誘導体について、中枢抑制作用の発現用量を参考に慢性処置の投与条件を選択することで、効率よく身体依存動物が作製できると考えられる。合成カンナビノイド誘導体の身体依存性を推測する生化学的マーカーとして、ノルアドレナリンおよびその代謝産物含量の増加が利用できると考えられる。また、NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を使用し、CP-55,940 処置による細胞毒性を評価したところ、濃度依存的に細胞毒性の発現が確認された。本研究では、合成カンナビノイド誘導体慢性処置動物を利用して、拮抗薬誘発による退薬症候試験を行うことで、身体依存性を評価できることが明らかになった。また、合成カンナビノイド誘導体の細胞毒性は、NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を利用することで、効率良く評価できることが確認された。

2. 合成カンナビノイド誘導体の薬物弁別試験

本研究では、合成カンナビノイド誘導体である CP-55,940 を標準薬とした、薬物弁別確立の訓練条件が明らかになった。また、合成カンナビノイド誘導体 WIN55212-2 において、CP-55,940 と類似の弁別刺激効果が発現した。さらに、合成カンナビノイド誘導体は、 Δ^9 -THC と類似の自覚効果（薬理効果）を示すことから、乱用危険性を有することが確認された。CP-55,940 の弁別刺激効果は、CB1 受容

拮抗薬 AM251 の併用により、有意に抑制された。一方、CB2 受容体拮抗薬 AM630 の併用において、抑制は認められなかった。したがって、合成カンナビノイド誘導体 CP-55,940 の弁別刺激効果は CB1 受容体を介して発現することが示唆された。CP-55,940 を標準薬（訓練薬）とした薬物弁別試験は、合成カンナビノイド誘導体の依存性評価に有効である。また、CB1 受容体に対して選択性の高い合成カンナビノイド誘導体は、乱用される危険性が高いものと考えられる。

3. フェネチルアミン系違法ドラッグによる神経細胞毒性の検討

本研究において、フェネチルアミン系の違法ドラッグ T-2C-H は、他の「2C シリーズ」と同じように、単独でドパミン系神経細胞ならびにモノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して強い細胞毒性を示すことが明らかになった。モノアミン系セロトニン含有神経細胞において、T-2C-H は核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化を伴う細胞死を惹起した。また、T-2C-H は非常に低濃度(50-100 μM)において、細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させた。T-2C-H の 2C-C とのセロトニン含有神経細胞への併用暴露では、単独では障害性のみられない濃度の T-2C-H は、2C-C による LDH 放出量の増加ならびにアポトーシス様の形態変化をさらに増強させ、T-2C-H による 2C-C の神経毒性に対する相乗効果がみられた。T-2C-H は、他の「2C シリーズ」と同様に、単独でドパミン系神経細胞ならびにセロトニン系神経細胞に対して極めて強い細胞毒性を示すこと、その毒性は「2C シリーズ」のなかでも極めて強いこと、さらに非常に低濃度の T-2C-H はセロトニン系神経細胞における 2C-C の神経毒性を増強させることを明らかにした。本研究で用いた蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、迅速かつ感度良く、しかも定量的に細胞毒性を解析できる評価法であり、乱用薬物の神経障害性の評価に有用であると考え

られる。

4. クラブユーザーにおける薬物乱用実態

対象者となったクラブユーザーの 33.8%は何らかの薬物使用経験を有し、大麻が 32.1%と最も高く、MDMA7.9%、覚せい剤 6.2%、コカイン 6.2%、有機溶剤 4.6%、ケタミン 3.3%と続いた。諸外国のクラブユーザーに比べれば低い値であるが、国内の一般住民や青少年と比較すると顕著に高い値である。また、解析の結果から、MDMA 使用者の特徴として、「①30 代男性が中心、②クラブカルチャーとの親和性が高い、③多剤乱用者が多い、④薬物使用に伴うエピソードが豊富⑤攻撃的行動との合併例が多い」が挙げられた。

薬物使用経験者が数多く集まるクラブという場・空間は、薬物乱用・依存に対する予防介入を効果的に行えるセッティングの一つである。薬物使用による健康被害に関する正しい情報を提供するとともに、相談援助につなげるような予防介入が必要である。

D. 結論

本研究より、CP-55,940 などの合成カンナビノイド誘導体は身体依存形成能を有することが明らかになった。合成カンナビノイド誘導体の慢性処置後、カンナビノイド受容体拮抗薬誘発による退薬症候の観察により、身体依存形成能を評価できることが明らかになった。また、違法ドラッグとして流通している合成カンナビノイドは、大麻成分である Δ^9 -THC と類似の弁別刺激特性を有することが明らかになった。合成カンナビノイド誘導体において、薬物による中枢作用の発現用量を参考に慢性投与条件を設定し、拮抗薬誘発による退薬症候観察により身体依存性を評価できることが明らかになった。

薬物弁別試験法は、標準となる薬物が示す自覚効果と他の薬物の自覚効果の類似性を評価できることから、合成カンナビノイド誘導体などの数多くの類縁誘導体が存在する違法ドラッグの中枢作用の解析に有用であること

が示唆された。また、フェネチルアミン系の違法ドラッグおよび合成カンナビノイド誘導体において、細胞毒性を示すことが明らかとなった。培養細胞を利用した細胞毒性の評価は、薬物単独および規制薬物との併用実験などの様々な環境設定が可能であり、迅速かつ正確な毒性評価法として有用である。本研究の総合評価システムは、違法ドラッグの身体依存性および神経毒性の迅速な評価法として有用であり、得られる科学データは規制根拠として活用できると考えられる。

こうした動物実験と培養細胞を利用する一連の薬物評価システムにより、違法ドラッグの身体依存性および神経毒性の検討を迅速に行うことが可能である。将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し、規制薬物指定への早期の対策に有用であると考えられる。規制薬物の構造修飾による薬物依存性および神経毒性発現の差異を検討することにより、特定の構造毒性相関を明らかにし、薬物乱用の危険性および神経毒性を予測することが可能になると考えられる。

実態調査の結果から、対象者となったクラブユーザーの 33.8%は何らかの薬物使用経験を有し、大麻が 32.1%と最も高いことが明らかになった。薬物使用経験者が数多く集まるクラブは、薬物乱用・依存に対する予防介入を効率的に行える場・空間の一つである。薬物使用による健康被害に関する正しい情報を提供するとともに、相談援助につなげるような予防介入が必要である。

E. 健康危険情報

本研究は、規制薬物と違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)である合成カンナビノイド誘導体と覚せい剤類似化合物の身体依存性および細胞毒性に関する研究であり、結果はすべて、健康危険情報に該当する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦. 合成カンナビノイド誘導体の薬理学的特性とその乱用について. 日本アルコール・薬物医学会雑誌 45(3): 167-174, 2010.
- 2) 船田正彦. 薬物依存評価のための動物モデル. 日本臨牀 68: 1459-1664, 2010.
- 3) 船田正彦. 大麻の薬理作用と薬物依存性. 医薬ジャーナル 46: 85-89, 2010.
- 4) Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Kimoto, N., Kikkawa, Y., Takeshima, M., Miyoshi, K. and Murata, M.: Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte. *Ann. Neurol.*, 67: 239-249, 2010. (published online October 2, 2009)
- 5) Morimoto, N., Nagai, M., Miyazaki, K., Ohta, Y., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Matsuura, T., Asanuma, M. and Abe, K.: Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J. Neurosci. Res.*, 88: 1804-1811, 2010.
- 6) Kitamura, Y., Yagi, T., Kitagawa K., Shinomiya, K., Kawasaki H., Asanuma, M. and Gomita, Y.: Effects of bupropion on the forced swim test and release of dopamine in the nucleus accumbens in ACTH-treated rats. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 382: 151-158, 2010. (published online June 6, 2010)
- 7) Doi, M., Miyazaki, I., Nagamachi, T., Shinomiya, K., Matsunaga, H., Sendo, T., Kawasaki, H., Asanuma, M., Gomita, Y. and Kitamura, Y.: Effects of imipramine and lithium on the suppression of cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Acta Med Okayama*, 64: 219-223, 2010.
- 8) Miyazaki, I. and Asanuma, M.:

- Antioxidative and neuroprotective effects of metallothioneins on dopaminergic neurons. In: (ed.) Kozyrev, D. and Slutsky, V., *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects*, Nova Science Publishers, New York, pp557-568, 2010.
- 9) Miyazaki, I., Asanuma, M., Kikkawa, Y., Takeshima, M., Murakami, S., Miyoshi, K., Sogawa, N. and Kita, T.: Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity. *Glia*, 59: 435-451, 2011.
 - 10) Kitamura, Y., Doi, M., Kuwatsuka, K., Onoue, Y., Miyazaki, I., Shinomiya, K., Koyama, T., Sendo, T., Kawasaki, H., Asanuma, M. and Gomita, Y.: Chronic treatment with imipramine and lithium increases cell proliferation in the hippocampus in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 34: 77-81, 2011.
 - 11) Ishida, S., Kawasaki, Y., Araki, H., Asanuma, M., Matsunaga, H., Sendo, T., Kawasaki, H., Gomita, Y. and Kitamura, Y.: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the central amygdaloid nucleus alter naloxone-induced withdrawal following a single exposure to morphine. *Psychopharmacology*, in press.
 - 12) 嶋根卓也 : 思春期の薬物乱用の現状と課題, *思春期学* 28(3); 267-272, 2010.
 - 13) 嶋根卓也 : 薬物依存症—薬物依存症のトレンド—薬物依存症の予防・防止の社会的取り組み, *日本臨牀* 68(8); 1531-1535, 2010.
 - 14) 森田展彰、嶋根卓也 : 薬物依存症—薬物依存症のトレンド—幻覚剤, *日本臨牀* 68(8); 1486-1493, 2010.
 - 15) 嶋根卓也 : アディクション 薬物乱用・依存. *Journal of Integrated Medicine*. 20(5), 356-359, 2010.
2. 学会発表
 - 1) 船田正彦, 富山健一, 青尾直也, 秋武義治, 三島健一, 藤原道弘, 和田清. 合成カンナビノイド誘導体の薬物依存性と細胞毒性の評価. 第40回日本神経精神薬理学会, 仙台, 2010. 9.15.
 - 2) 船田正彦. 大麻乱用の有害作用: 精神依存形成と細胞毒性の発現について. 第45回日本アルコール薬物医学会, 小倉, 2010. 10.8.
 - 3) 富山健一, 和田清, 船田正彦. カンナビノイド受容体作用薬の弁別刺激特性と細胞毒性. 第45回日本アルコール薬物医学会, 小倉, 2010. 10.9.
 - 4) 竹島美香, 宮崎育子, 吉川友理, 喜多大三, 浅沼幹人 : L-テアニンはアストロサイトのグルタチオンを増加させ, 過剰ドパミンによる神経細胞死を抑制する. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16.
 - 5) 宮崎育子, 吉川友理, 竹島美香, 浅沼幹人 : 活性化アストロサイトにおけるドパミントランスポーターを介したドパミン特異的メタロチオネイン誘導. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16.
 - 6) 村田麻衣子, 浦添夏帆, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三 : 培養ドパミン神経系におけるメタンフェタミン神経毒性に対するドコサヘキサエン酸の作用. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.16.
 - 7) 土居真穂, 長町智子, 江川真希, 宮崎育子, 川崎博己, 千堂年昭, 浅沼幹人, 北村佳久 : ACTH 反復投与ラットを用いた海馬歯状回における細胞増殖およびアストログリア活性に及ぼす影響. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
 - 8) 八木貴彦, 宮崎敏明, 北川航平, 四宮一昭, 浅沼幹人, 千堂年昭, 北村佳久 : ACTH 反復投与ラットを用いた bupropion の抗うつ効果におけるドパミン神経機能の関与. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.

- 9) 石田 茂, 生田祐一, 浅沼幹人, 松永 尚, 千堂年昭, 荒木博陽, 川崎博己, 北村佳久: Nicotine の扁桃体内注入は morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘導条件付け場所嫌悪行動を抑制する. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
- 10) 生田祐一, 石田 茂, 宮崎育子, 浅沼幹人, 荒木博陽, 松永 尚, 北村佳久, 千堂年昭: Morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘導条件付け場所嫌悪行動および c-Fos 発現に対するニコチン受容体の関与. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.17.
- 11) 田中健一, 難波 雄, 小郷裕也, 園田佳奈子, 田村明子, 浅沼幹人: アセチルコリンエステラーゼ阻害薬ガラントミンのニコチン受容体を介した学習能力改善作用. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010.3.18.
- 12) 浅沼幹人: アストロサイトを標的とした神経保護の可能性. 第 51 回日本神経学会総会 ランチョンセミナー5, 東京, 2010.5.20.
- 13) 浅沼幹人, 宮崎育子: 線条体アストロサイトにおける L-DOPA およびドパミンの取り込みと代謝. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 2010.5.21.
- 14) 石田 茂, 河崎陽一, 浅沼幹人, 松永 尚, 千堂年昭, 荒木博陽, 川崎博己, 北村佳久: Morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘発条件付け場所嫌悪行動に対する扁桃体中心核内 $\alpha 7$ ニコチン受容体の関与. 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 徳島, 2010.7.8.
- 15) Ishida, S., Ukutam, T., Miyazaki, I., Asanuma, M., Matsunaga, H., Senndo, T., Araki, H., Kawasaki, H., Kitamura, Y.: Involvement of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on the conditioned place aversion induced by naloxone in single-dose morphine-treated rats. The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (World Pharma2010), Copenhagen, 2010.7.17-23.
- 16) Kitamura, Y., Doi, M., Hayashi, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Kawasaki, H.: Influence of the suppression of cell proliferation and neurogenesis in the ability of antidepressants in an ACTH-induced animal model of treatment-resistant. The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (World Pharma2010), Copenhagen, 2010.7.17-23.
- 17) 三好 耕, 笠原恭輔, 宮崎育子, 浅沼幹人: リチウムは神経細胞 1 次繊毛を伸長する. 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会, 神戸, 2010.9.3.
- 18) 宮崎育子, 吉川友理, 竹島美香, 三好 耕, 喜多大三, 浅沼幹人: アストロサイトによるドパミンキノン毒性に対する神経保護. 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会, 神戸, 2010.9.3.
- 19) 浦添夏帆, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: アセチル-L-カルニチンの培養グリア細胞系への作用. 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 埼玉, 坂戸, 2010.9.10-12.
- 20) 竹島美香, 宮崎育子, 喜多大三, 浅沼幹人: 緑茶成分テアニンはアストログリアでのグルタチオン合成促進を介して酸化ストレスによる神経細胞死を抑制する. 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 埼玉, 坂戸, 2010.9.10-12.
- 21) 竹島美香, 宮崎育子, 吉川友理, 村上真樹, 喜多大三, 浅沼幹人: 緑茶成分テアニンのアストロサイトでの抗酸化機構の賦活作用とドパミン神経保護効果. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.15.
- 22) 宮崎育子, 吉川友理, 竹島美香, 三好 耕, 船田正彦, 浅沼幹人: フェニルアルキル

- アミン系違法ドラッグによるモノアミン神経毒性に関する検討. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 23) 浦添夏帆, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: 培養グリア細胞系におけるメタンフェタミン細胞毒性に対するアセチル-L-カルニチンの作用. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 24) 石田 茂, 河崎陽一, 浅沼幹人, 松永 尚, 千堂年昭, 荒木博陽, 川崎博己, 北村佳久: Morphine 単回投与ラットの naloxone 誘発退薬行動に対する nicotine の効果における扁桃体の関与. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 25) 田中健一, 難波 雄, 八木崇夫, 園田佳奈子, 浅沼幹人: 一過性健忘モデルマウスに対するニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ サブユニット作動薬の学習能力改善作用. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010.9.16.
- 26) 三好 耕, 笠原恭輔, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人: 繊毛が媒介する非シナプス性の神経伝達と精神疾患. 第 32 回日本生物学的精神医学会, 北九州, 2010.10.9.
- 27) 笠原恭輔, 三好 耕, 宮崎育子, 浅沼幹人: メタンフェタミンが神経細胞一次繊毛に及ぼす影響. 第 32 回日本生物学的精神医学会, 北九州, 2010.10.9.
- 28) 浦添夏帆, 村田麻衣子, 竹島美香, 宮崎育子, 浅沼幹人, 喜多大三: メタンフェタミンによるグリア細胞毒性発現とアセチル-L-カルニチンの細胞保護効果について. 第 63 回日本薬理学会西南部会・第 20 回日韓薬理学会合同セミナー, 鹿児島, 2010.11.26.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
違法ドラッグの精神依存並びに精神障害の発症機序と乱用実態把握に関する研究
(H21-医薬-一般-031)

分担研究報告書

合成カンナビノイドの身体依存性および細胞毒性の評価

分担研究者：船田正彦（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）
研究協力者：富山健一（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）
：青尾直也（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

大麻と類似の作用を示す合成カンナビノイド誘導体が、違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)として流通しており、その乱用が問題となっている。条件付け場所嗜好性試験等の評価から、大麻及び合成カンナビノイド誘導体は、精神依存形成能を有する危険性が明らかになっている。一方、合成カンナビノイド誘導体の身体依存性については検討がなされていない。本研究では、合成カンナビノイド誘導体である (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol (CP-55,940) に着目して、慢性投与による身体依存形成の有無について評価した。また、退薬症候発現時の脳内モノアミン神経系の変化についても解析した。1) 身体依存性：CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) の慢性投与は 1 日 2 回 5 日間にわたって行なった。6 日目に CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) を投与し 4 時間後にカンナビノイド受容体拮抗薬である N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251, 1 mg/kg, i.p.) 投与によって誘発される退薬症候の観察を行なった。その結果、跳躍行動、身震い行動および立ち上がり行動増加などの異常行動の発現が確認された。また、高架式十字迷路試験により、不安が惹起される可能性が示唆された。2) 脳内モノアミンに対する影響：AM251 誘発退薬症候の観察後、大脳皮質を分画し HPLC 法に従ってノルアドレナリンおよび代謝産物の含量を測定した。CP-55,940 慢性処置動物では、AM251 の投与によりノルアドレナリンおよびノルアドレナリン代謝産物である 3-methoxy-4-hydroxy-phenyl-ethyleneglycol (MHPG) の有意な増加が認められた。CP-55,940 慢性処置により身体依存が形成され、急激な作用の遮断により激しい退薬症候が誘発されることが明らかになった。また、退薬症候の発現において、脳内ノルアドレナリン神経系の過剰興奮が一部関与する可能性が示唆された。カンナビノイド誘導体の身体依存性を推測する生化学的マーカーとして、AM251 誘発の脳内のノルアドレナリンおよびノルアドレナリン代謝産物含量の増加が利用できると考えられる。3) 細胞毒性：NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を使用し、CP-55,940 処置による細胞毒性を評価したところ、濃度依存的に細胞毒性の発現が確認された。本研究より、CP-55,940 などの合成カンナビノイド誘導体は身体依存形成能を有することが明らかになった。また、細胞に対して毒性を示す危険性も有すると考えられる。合成カンナビノイド誘導体の慢性処置後、カンナビノイド受容体拮抗薬誘発による退薬症候の観察により、身体依存形成能を評価できることが明らかになった。また、合成カンナビノイド誘導体の細胞毒性は、NG108-15 細胞およびマウス大脳皮質初代培養細胞を利用することで、効率良く評価できることが確認された。

A. 研究目的

我が国では、2000年以降、法規制を受けている麻薬や覚せい剤と類似構造を有する化学物質が、法規制がされていない薬物「違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）」と称して販売され、その乱用が増加している¹⁻³⁾。乱用される薬物の種類が増加しており、「乱用薬物の多様化」が進行している。既存の乱用薬物に加えて、こうした化学物質の乱用による重篤な健康被害が発生し、大きな社会問題となっている。

近年の大麻乱用の拡大に並んで、大麻と類似の効果を有する合成カンナビノイドの乱用拡大が問題となっている。この合成カンナビノイドは、通称「スパイス」という呼称で流通しており、世界的にその乱用が拡大していると考えられる⁴⁾。我が国においても、スパイスはカラフルな大きな瞳のロゴが印刷されたパッケージ製品として、天然ハーブ等と称してインターネットや路上販売などにより流通していることが判明している。違法ドラッグとして、スパイスには「スパイスゴールド、スパイスダイヤモンド」、その他には「ユカタンファイヤー」「スモーク」など幾つかのバリエーションが存在しているが、なんらかの植物の乾燥品に合成カンナビノイド誘導体を混入させるという偽装を行っているのが特徴である。現在までに、ドイツにおいて、スパイスシリーズの成分解析が進んでおり、実際に検出されている合成カンナビノイド誘導体としては 5-(1,1-dimethylheptyl)-2-(3-hydroxy-cyclohexyl)-phenol (CP-47,497) およびその側鎖の炭素数が異なる 5-(1,1-dimethyloctyl)-2-(3-hydroxy-cyclohexyl)-phenol (CP-47,497-C8)、1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole (JWH-018)などが検出されている⁴⁾。さらに、複数の合成カンナビノイド誘導体が混入している製品も発見されており、実際の含有成分については多くのバリエーションが存在するようである。

我が国においては、合成カンナビノイド誘

導体として (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-phenyl]-trans-4-(3-hydroxy-propyl)cyclohexanol (CP-55,940)、CP-47,497、CP-47,497-C8 および JWH-018 について、その流通が確認されている⁴⁾。流通が確認されている合成カンナビノイドの多くは、大麻の主要な精神活性成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)の作用点であるカンナビノイド受容体への結合能を有するため、類似の中樞作用が発現すると考えられている。

本事業1年目では、数種の合成カンナビノイドが有する薬物の精神依存性について、条件付け場所嗜好性試験により迅速な評価が可能であることを示した⁵⁾。一方、薬物依存性には、精神依存性と身体依存性があるが、合成カンナビノイドによる身体依存性の評価は十分に行われていない。また、細胞毒性の評価については、樹立細胞株である NG108-15 細胞を利用する方法を構築しているが、脳神経細胞への影響を詳細に検討するためには、初代培養細胞を利用した細胞毒性の評価システム構築は不可欠である。

本研究では、合成カンナビノイドである CP-55,940 に着目して、慢性投与による身体依存形成の有無について評価した。また、薬物乱用危険性を予測し得る生化学的マーカー検索の一環として、退薬症候発現時の脳内モノアミン神経系の変化についても解析した。同様に、マウス大脳皮質初代培養細胞を利用した、合成カンナビノイド細胞毒性の評価システム構築を試みた。合成カンナビノイドの身体依存性および細胞毒性を評価するシステム構築に関する基礎検討を実施した。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR系雄性マウス (Jcl, 20 - 25g, 日本クレア) を使用した。

使用薬物：合成カンナビノイドとしては、(-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-

phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol (CP-55,940, Cayman Chem.)、5-(1,1-dimethylheptyl) -2-(3-hydroxy-cyclohexyl) -phenol (CP-47,497, Cayman Chem.)、5-(1,1-dimethyloctyl) -2-(3-hydroxy-cyclohexyl)- phenol (CP-47,497-C8, 国立医薬品食品研究所:花尻瑠理先生、合田幸広先生より譲渡) (構造式 Fig. 1)、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬として N-(Piperidin-1-yl) -5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl) -4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251, Tocris Bioscience)およびカンナビノイド CB2 受容体拮抗薬として 6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl][4-methoxyphenyl]methanone (AM630, Tocris Bioscience)を使用した。

1. 合成カンナビノイド誘導体の身体依存性

CP-55,940 慢性処置による身体依存形成について評価した。急性実験から CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) により投与 30 分でカタレプシーおよび体温下降の発現が確認された。そこで、CP-55,940 の用量を 1 mg/kg (s.c.) として、CP-55,940 慢性投与は 1 日 2 回 5 日間にわたって行なった (Table A)。6 日目に CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) を投与し 4 時間後にカンナビノイド受容体拮抗薬である AM251 (1 mg/kg, i.p.) 投与によって誘発される退薬症候の観察を行なった。AM251 投与直後、プラスチック円筒シリンダー (高さ 31cm、内径 18cm) 内へ動物を留置し、ビデオカメラ (DCR-PC100, SONY) にて 30 分間撮影を行った。観察項目は、跳躍行動、身震い、立ち上がり行動、前足の震せんとした。対照群は溶媒である 0.4% (DMSO+Tocrisolve 100) 含有生理食塩液を投与した。

Table A. 薬物投与スケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6
AM	○	○	○	○	○	○
PM	○	○	○	○	○	退薬症候観察

○：薬物

2. 合成カンナビノイド誘導体退薬時の不安作用

CP-55,940 慢性処置による身体依存形成後の不安惹起について評価した。CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) の慢性投与は 1 日 2 回 5 日間にわたって行なった。6 日目に CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) を投与し、24 時間後に高架式十字迷路試験^{6,7)}を行なった。高架式十字迷路装置 (PM-40, Melquest) は、壁のない走行路 (オープンアーム) と壁で囲まれている走行路 (クローズドアーム) で構成される十字迷路で構成され、十字迷路は床面から 65cm の高さに設置した (Fig. A)。十字迷路の中心部分に動物をおき、5 分間のオープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間を測定した。

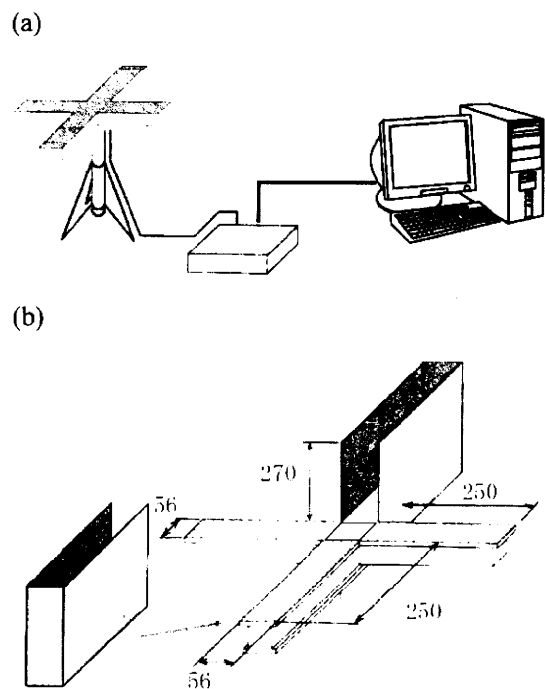


Fig A. 高架式十字迷路

(a)本システムはコンピュータ制御による完全自動測定機器となっている。(b)本装置は壁のない走行路 (オープンアーム) と壁で囲まれている走行路 (クローズドアーム) で構成され、高さ 65cm に設置される。

3. 合成カンナビノイド誘導体退薬時の脳内モノアミンに対する影響

CP-55,940 慢性処置動物に AM251 を投与し、30 分後にマウス全脳を摘出し、脳内ノルアドレナリン神経系の主要投射先である大脳皮質を分画⁸⁾した。対照群は溶媒である 0.4% (DMSO+Tocrisolve 100) 含有生理食塩液を投与した。高速液体クロマトグラフ (HPLC-ECD)法に従い、内標準物質としてイソプレテレンールを使用し、ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンおよび関連代謝産物の測定を行った。ノルアドレナリン代謝産物としては 3-methoxy-4-hydroxy-phenylethyleneglycol (MHPG)、ドパミン代謝産物として、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanilic acid (HVA)、セロトニンの代謝産物としては 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)について解析した。

4. 合成カンナビノイド誘導体による細胞毒性

マウス由来 N18TG2 神経芽細胞とラット由来 C6-BU-1 グリア細胞のハイブリッド細胞株である NG108-15 細胞(1×10^5 cells/cm²)を使用し、継代 24 時間後に、CP-55,940(最終濃度 30 μM)を添加し、2 時間後の影響を検討した。マウス大脳皮質初代培養神経細胞は、培養 8 日後の細胞を使用して評価した。CP-55,940(最終濃度 30 μM)を添加し、2 時間後の影響を検討した。それぞれの対照群は溶媒である 0.1% (DMSO+Tocrisolve 100)を処置した。細胞毒性は CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay (Promega, Inc.) を使用し、死細胞由来プロテアーゼ活性を細胞毒性のマーカーとして測定した。また、アポトーシス誘導については、Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Applied Science) によって annexin 染色および propidium iodide (PI)による核染色の解析を行なった。

C. 研究結果

1. 合成カンナビノイド誘導体の身体依存性

CP-55,940 (1 mg/kg, s.c.) の慢性投与による身体依存形成能を評価した。CP-55,940 慢性

投与期間中、マウスの一般行動に影響は認められなかった。CP-55,940 慢性投与動物においてカンナビノイド受容体拮抗薬 AM251 を投与したところ、跳躍行動、身震い行動および立ち上がり行動などの異常行動の発現が確認された。特に、跳躍行動及び立ち上がり行動の発現頻度については、著しい増加が確認された(Fig. 2)。

2. 合成カンナビノイド誘導体退薬時の不安惹起

CP-55,940 慢性投与動物において、休薬 24 時間後、高架式十字迷路試験により、不安惹起の有無について検討した。CP-55,940 の休薬により、壁のない走行路 (オープンアーム) の滞在時間の短縮が観察された(Fig. 3A)。一方、壁で囲まれている走行路 (クローズドアーム) における滞在時間は延長していたが、滞在中の運動量については有意な影響は認められなかった(Fig. 3B)。

3. 合成カンナビノイド誘導体退薬時の脳内モノアミンに対する影響

CP-55,940 慢性投与動物に、AM251 投与 30 分後に、大脳皮質を分画し HPLC-ECD 法に従って、モノアミン関連物質の含量を測定した (Fig. 4)。CP-55,940 慢性投与後の、大脳皮質においてノルアドレナリン含量セロトニン含量ドパミン含量、関連代謝産物において有意は認められなかった。

CP-55,940 慢性投与動物に、AM251 投与したところ、ノルアドレナリン含量およびノルアドレナリン代謝産物である MHPG 含量は有意な増加が認められた。AM251 投与により、セロトニン含量においても有意な増加が認められた。一方、セロトニン代謝産物である 5-HIAA は有意な影響が認められなかった。同様に、ドパミン含量およびドパミン代謝産物である HVA 含量においても有意な影響は認められなかった。

4. 合成カンナビノイド誘導体による細胞毒性

NG108-15 細胞 : NG108-15 細胞を使用し、CP-55,940 (10 μ M)、CP-47,497 (10 μ M) および CP-47,497-C8 (10 μ M)を添加し、2時間後の影響を検討した。死細胞由来プロテアーゼ活性を細胞毒性のマーカーとして解析したところ、すべての薬物において、細胞毒性が誘導された。その細胞毒性発現の強度は、CP-47,497-C8 > CP-55,940 > CP-47,497 であった(Fig. 5)。また、Annexin-V-FLUOS 染色による解析から、CP-55,940 により主にアポトーシスが誘導されていることが明らかになった(Fig. 6A)。さらに、CP-55,940 添加による細胞毒性の発現は、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって、完全に抑制された。一方、CP-55,940 による細胞毒性の発現は、カンナビノイド CB2 受容体拮抗薬 AM630 の前処置では、有意な影響は認められなかった(Fig. 6B)。同様に、CP-47,497 および CP-47,497-C8 添加による細胞毒性の発現においても、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって、毒性の発現は完全に抑制された(Fig. 7)。

マウス大脳皮質初代培養神経細胞 : CP-55,940 (30 μ M)、CP-47,497 (30 μ M) および CP-47,497-C8 (30 μ M) を添加し、2時間後の影響を検討した。総ての合成カンナビノイドにおいて細胞毒性が誘導された(Fig. 8)。

D. 考察

合成カンナビノイド誘導体は、「スパイス」という呼称で世界的に流通が確認されており、我が国においても乱用拡大が懸念される違法ドラッグである⁴⁾。合成カンナビノイド誘導体として、 Δ^9 -THC の化学構造を含む ABC-tricyclic cannabinoid 誘導体を classical cannabinoid 誘導体、この構造を部分的に含む AC-bicyclic cannabinoid 誘導体である CP-47,497 や CP-55,940 および aminoalkylindole 誘導体である JWH-018 などは nonclassical cannabinoid 誘導体として大きく2つのグループに分類されている(Fig. 1)⁹⁾。

本研究では、違法ドラッグとして流通が確認されている合成カンナビノイド誘導体である CP-55,940 の身体依存性について脳内モノアミン神経系の関連性ととともに検討した。CP-55,940 慢性処置動物において、慢性投与期間中、マウスの一般行動に変化は無く、薬物の連続投与による毒性等の発現は認められなかった。一方、CP-55,940 慢性投与動物においてカンナビノイド受容体拮抗薬 AM251 を投与したところ、跳躍行動、身震い行動および立ち上がり行動の発現が確認された。これらの行動変化は、モルヒネやヘロイン等のオピオイド受容体作用薬の慢性処置により身体依存が形成されている場合に、オピオイド受容体拮抗薬のナロキソン投与によって誘発される退薬症候と非常に類似しており、身体依存形成を裏付ける証拠である。

本研究では、高架式十字迷路試験を利用して、不安の惹起を評価した。高架式十字迷路試験は、抗不安薬をスクリーニングするための不安関連行動評価法として開発され、広く用いられている^{6,7)}。また、薬効評価のみならず、遺伝子改変動物や疾患モデル動物の情動機能、特に不安関連行動の行動学的表現型を検索するためのテストバッテリーの一つとしても応用されている。本研究において、CP-55,940 退薬症候による不安惹起について、高架式十字迷路試験により評価した。その結果、壁のない走行路の滞在時間の短縮が観察され、不安状態にあることが確認された。一方、壁で囲まれている走行路における滞在時間は延長していたが、滞在中の運動量については有意な影響は認められなかったことから、運動機能障害等に基づく滞在時間の短縮ではないことが確認された。合成カンナビノイドの身体依存状態では、退薬症候により不安が惹起されると考えられる。現在までに、合成カンナビノイドである R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3- [(morpholinyl) methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4- benzoxazinyl]- (1-naphthalenyl) methanone mesylate (WIN 55212-2)の慢性処置によっても身体依存が形

成され、カンナビノイド受容体拮抗薬 (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) によって退薬症候が誘発されることが報告されている¹⁰⁾。一方、臨床報告からも CP-47,497、CP-47,497-C8 および JWH-018 などを含んだスパイスの長期乱用により、断薬により退薬症候が発現することも報告されている¹¹⁾。今回の結果から、CP-55,940 慢性投与により身体依存が形成される危険性が示唆された。

CP-55,940 退薬症候発現時の、脳内モノアミン神経系の変化について解析したところ、大脳皮質においてノルアドレナリンおよびセロトニン含量の有意な増加が確認された。合成カンナビノイドの退薬症候発現には、脳内ノルアドレナリン神経系およびセロトニン神経系の過剰興奮が関与している可能性が示唆された。現在までに、モルヒネ退薬症候発現時に、脳内ノルアドレナリン神経系およびセロトニン神経系の過剰興奮が引き起こされることが報告されている^{12,13)}。行動変化と同様、神経科学的な変化においても、合成カンナビノイドの慢性使用により身体依存が形成されることを支持する結果となった。

以上の結果から、合成カンナビノイドの慢性使用により、身体依存が形成され、断薬により退薬症候が発現することが明らかになった。退薬症候発現には、脳内ノルアドレナリン神経系およびセロトニン神経系の過剰興奮が関与している可能性が示唆された。

本研究では、CP-55,940 退薬症候状態において、モルヒネ退薬症候の行動変化と同様、ノルアドレナリン神経系の変化においても、類似の変化が確認されたことから、合成カンナビノイドの慢性使用により、身体依存が形成される危険性があると考えられる。

したがって、合成カンナビノイド慢性処置動物において、退薬時の脳内(大脳皮質)におけるノルアドレナリンおよびセロトニン含量の増加は、身体依存形成能を有する危険性を示す生化学的マーカーとして利用できること

が示唆された。

本研究では、合成カンナビノイドの有する細胞毒性を迅速かつ高感度で検出する樹立細胞株および初代神経培養細胞を利用した評価系の構築を試みた。樹立細胞株として、カンナビノイド受容体の発現が確認されている NG108-15 細胞¹⁴⁾を使用して、合成カンナビノイド誘導体添加による細胞毒性の発現について検討した。細胞毒性発現の評価は、死細胞由来プロテアーゼ活性を細胞毒性のマーカーとして解析した。CP-55,940 添加により細胞毒性が誘導された。同様に、annexin 染色および propidium iodide (PI)による核染色の解析から、アポトーシスが誘導されていることが明らかになった。また、CP-55,940 添加による細胞毒性の発現は、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって、完全に抑制され、カンナビノイド CB2 受容体拮抗薬 AM630 の前処置では、有意な影響は認められなかった。したがって、NG108-15 細胞において、CP-55,940 はカンナビノイド CB1 受容体を介して細胞毒性を示し、アポトーシスが誘導されることが明らかになった。

NG108-15 細胞を使用して、CP-47,497 および CP-47,497-C8 の細胞毒性について検討した。CP-47,497 および CP-47,497-C8 の添加により細胞毒性が発現し、この効果は、カンナビノイド CB1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって完全に抑制された。これらの結果から、CP-47,497 および CP-47,497-C8 による細胞毒性の発現には、カンナビノイド CB1 受容体が関与していることが明らかになった。合成カンナビノイドは細胞毒性を誘発し、その発現においてカンナビノイド CB1 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究において、細胞毒性発現の強度は、CP-47,497-C8 > CP-55,940 > CP-47,497 であった。受容体結合実験から、カンナビノイド受容体への受容体親和力は CP-47,497-C8、CP-55,940 > CP-47,497 であることが報告されている^{15,16)}。したがって、細胞毒性の発現においては、CP-47,497 のシクロヘキサンの環の