

Table 2 Inhibitory Effect and IC<sub>50</sub> Values of APICA, APINACA and AB-001 on Radioligand Binding to Cannabinoid Receptors

Assay name	Substance	Substance concentration (mol/L)										IC <sub>50</sub> (mol/L)
		3×10 <sup>-10</sup>	1×10 <sup>-9</sup>	3×10 <sup>-9</sup>	1×10 <sup>-8</sup>	3×10 <sup>-8</sup>	1×10 <sup>-7</sup>	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>	
		Inhibition (%)										
Cannabinoid CB1 (Human)	APICA	-	-	0.00	7.80	30.85	46.48	61.30	72.37	97.00	100.00	1.75×10 <sup>-7</sup>
	APINACA	-	-	1.68	0.00	14.54	19.18	35.76	47.70	67.07	84.13	8.24×10 <sup>-7</sup>
	AB-001	-	-	0.00	1.47	4.07	18.96	28.03	48.02	72.38	84.99	9.27×10 <sup>-7</sup>
	JWH-018	-	-	1.51	22.06	35.45	45.84	50.73	63.09	78.66	88.43	1.69×10 <sup>-7</sup>
	(R)-(+)-WIN55212-2	3.05	0.00	19.04	23.95	50.55	75.06	81.65	89.12	-	-	3.20×10 <sup>-8</sup>
Cannabinoid CB2 (Human)	APICA	-	-	4.25	15.90	27.61	38.31	59.76	72.97	82.89	91.19	1.76×10 <sup>-7</sup>
	APINACA	-	-	2.17	0.00	11.86	25.03	37.61	66.98	82.36	91.89	4.30×10 <sup>-7</sup>
	AB-001	-	-	1.76	0.00	2.36	15.09	35.14	46.38	72.31	86.27	8.99×10 <sup>-7</sup>
	JWH-018	-	-	0.00	0.00	13.19	21.56	34.77	60.66	71.43	89.41	5.93×10 <sup>-7</sup>
	(R)-(+)-WIN55212-2	0.86	10.98	34.55	61.87	72.64	81.07	91.61	100.00	-	-	9.51×10 <sup>-9</sup>

- : Not assayed

Data are expressed as the mean values of duplicate samples.

分担研究課題:違法ドラッグの分析に関する研究

分担研究者:豊岡利正 静岡県立大学薬学部 教授

—超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)を用いた

違法ドラッグ成分の光学異性体分離法および迅速な分析法の開発—

研究協力者:轟木 堅一郎 静岡県立大学薬学部 准教授

研究要旨:青少年の間で違法ドラッグの乱用に伴う健康被害が頻発しており、大きな社会問題となっている。一般に、多くの違法ドラッグ成分は光学活性化合物であり、光学異性体間でその薬理作用が異なることから、光学異性体を弁別して分析する意義は大きいと考えられる。また、違法ドラッグ成分や不純物成分の光学異性体比を測定することは、製造方法や製造元、入手経路の解明にも繋がるのが期待される。本研究では近年指定薬物に指定されたカンナビシクロヘキサノールおよびCP47,497のキラル蛍光誘導体化-超高速LC分析法による光学異性体分離法の開発に取り組んだ。キラル蛍光誘導体化試薬である(S)-(-)-DBD-Pro-COClによる誘導体を施すことにより、各エナンチオマーを完全分離しつつ両薬物を高感度検出することができた。また、生成した誘導体の構造確認についても行った。今回確立した誘導体化反応条件では、2種類の誘導体が生成していたため、誘導体を1種類に収束させるべく最適化を試みたが、誘導体を1種類に収束させることはできなかった。今後、2種類の誘導体のうちいずれかの成分を用いてバリデーション(定量性、分析再現性、定量・検出限界)を実施することで、実試料分析にも十分適用可能であると考えられる。また、今回開発した方法論は、反応性官能基(アミン、フェノール、アルコール)を有する光学活性な違法ドラッグ成分の多くに対しても有用であると考えられ、その適用が期待できる。

#### A. 研究目的

青少年の間で違法ドラッグの乱用に伴う健康被害が頻発しており、大きな社会問題となっている。違法ドラッグは1998年頃から一部の薬物マニアの間で流行し始めたと推定され、現在では、アダルトグッズショップ、インターネット等の通信販売などで「合法ドラッグ」「脱法ドラッグ」などと称して半ば公然と販売されている。違法ドラッグは、薬事法違反である疑いが強いにもかかわらず、麻薬や向精神薬に指定された成分は含有していないため、近年、その乱用がますます拡大する傾向にある。また、違法ドラッグの過量摂取や数種類の違法ド

ラッグの併用によるものと疑われる中毒等の健康被害や事故(死亡例を含む)が発生している。さらに、違法ドラッグの使用をきっかけに麻薬や覚せい剤の使用に発展したと思われる事例も報告されており、麻薬や覚せい剤等へのゲートウェイとなる危険性も高まっている。2007年に導入された指定薬物制度により、違法ドラッグに対する規制が強化され、指定薬物の流通は減少したものの、実際には法規制を逃れることを目的とした構造類似化合物が次々と登場していることやネット社会による流通の多様化から、対策がなかなか追いつかないのが現状であり、今後も多数の化合物が違法ド

ラッグ成分として流通することが懸念される。したがって、違法ドラッグ成分およびその構造類似化合物の簡便なスクリーニング法の開発が望まれる。

一般に、多くの違法ドラッグ成分は光学活性化化合物であり、光学異性体間でその薬理作用が異なることから、光学異性体を弁別して分析する意義は大きいと考えられる。また、違法ドラッグ成分や不純物成分の光学異性体比を測定することは、製造方法や製造元、入手経路の解明にも繋がるのが期待される。近年、LC-MS/MS 装置などの進歩により、多くの違法ドラッグ成分を誘導体化などの化学修飾を施すことなく高感度分析できるようになったが、光学異性体成分のキラル分析については、汎用の LC-MS/MS 装置では分析不可能である。そのため、光学活性化違法ドラッグ成分を簡便かつ高感度にキラル分析できる方法論の確立が求められている。

以上のような背景から、本研究では近年指定薬物に指定されたカンナビシクロヘキサノールおよび CP47,497 のキラル蛍光誘導体化-超高速液体クロマトグラフィー分析法による光学異性体分析法の開発に取り組んだ。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

今回試料として用いた (1RS,3SR)-3-[2-Hydroxy-4-(2-methylnonan-2-yl)-phenyl]cyclohexan-1-ol (カンナビシクロヘキサノール) と CP47,497 は、それぞれ 20  $\mu$ M 脱水ベンゼン溶液として調製したものを標準溶液として分析に用いた。Fig. 1 に両化合物の構造式を示した。キラル蛍光誘導体化試薬として、(S)-(-)-4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-(2-chloroformylpyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole ((S)-(-)-DBD-Pro-COCl, 東京化成) を、反応溶媒として脱水ベンゼン(関東化学)およびピリジン(和光純薬)を、移動相にはアセトニトリル(関東化学)、およびギ酸(和光純薬)をそれぞれ使用した。

### 2. (S)-(-)-DBD-Pro-COCl による薬物のキラル蛍光誘導体化反応

(S)-(-)-DBD-Pro-COCl によるカンナビシクロヘキサノールおよび CP47,497 のキラル蛍光誘導体化反応式を Fig. 2 に示す。20  $\mu$ M のカンナビシクロヘキサノールおよび CP47,497 の脱水ベンゼン溶液 1 mL にピリジン 3  $\mu$ L を混和後、5 mM (S)-(-)-DBD-Pro-COCl の脱水ベンゼン溶液 1 mL を加え、60°C で 3 時間加熱した。反応液に 5% (w/v)炭酸水素ナトリウム水溶液 2 mL を加えることで未反応の(S)-(-)-DBD-Pro-COCl を水層に移行させた後、有機層の 1 mL を採取した。溶媒留去後、残渣を 50%(v/v)アセトニトリル水溶液 500  $\mu$ L に溶解し、その 10  $\mu$ L を UHPLC-PDA-FL または UPLC-FL-ESI-TOF-MS に注入した。

### 3. UHPLC-PDA-FL システム

超高速 LC-PDA-蛍光分析システム (UHPLC-PDA-FL) として、島津 Nexera (島津製作所) を使用した。本機は、移動相送液ポンプ (LC-30AD)、カラムオープン (CTO-30AC)、オートサンプラー (SIL-30AC)、PDA 検出器 (SPD-M20A)、蛍光検出器 (RF-20A<sub>XL</sub>)、およびシステムコントローラー (CBM-20A) から構成されており、解析用ソフトウェアには Lab Solutions LC/GC Ver. 5 を使用した。PDA 検出器では波長 254 nm における吸光度を、蛍光検出器では励起 450 nm、蛍光 560 nm に設定したときに生じた蛍光強度をそれぞれモニターした。

### 4. UPLC-FL-ESI-TOF-MS システム

超高速 LC-蛍光分析-ESI-TOF-MS 分析システム (UPLC-FL-ESI-TOF-MS) として、Waters ACQUITY Ultra Performance LC (送液ポンプ、カラムオープン、オートサンプラー)、蛍光検出器として Waters FLR、TOF-MS として Waters Premier XE TOF-MS、自動解析ソフトとして MassLynx Ver 4.0 を使用した。蛍光検出器では励起 450 nm、蛍光 560 nm に設定したときに生じた蛍光強度をそれぞれモニターした。TOF-MS 測定はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の positive ion mode

(ESI<sup>+</sup>)の V mode で行い、測定範囲は m/z 100-1000とした。

## 5. LC 分離条件

カラムに ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100 mm, Waters)を使用した。移動相には、アセトニトリル-水-ギ酸 (80 : 20 : 0.1 (v/v), カンナビシクロヘキサノール分析), アセトニトリル-水-ギ酸 (70 : 30 : 0.1 (v/v), CP47,497 分析)をそれぞれ用い、流速 0.3 mL/min で送液した。

## C. 研究結果

### 1. カンナビシクロヘキサノール分析における PDA および蛍光クロマトグラム

(S)-(-)-DBD-Pro-COCl でカンナビシクロヘキサノール(注入量あたり 200 pmol)を蛍光誘導体化したときの(A) PDA および(B) 蛍光クロマトグラムを示す (Fig. 3)。いずれのクロマトグラムにおいても、7.5 min 付近に試薬が1つ導入された誘導体のピークが、12 min 付近に試薬が2つ導入された誘導体のピークがそれぞれ2本ずつ観測された。今回分析に用いたカンナビシクロヘキサノール標品はラセミ体であり、(S)-(-)-DBD-Pro-COClとの反応により、それぞれジアステレオマーを形成する。これにより逆相系の ODS カラムを用いてもジアステレオマー同士を十分に分離することができた。ジアステレオマー同士の分離度 ( $R_s$ )は、試薬が1つ導入された誘導体同士では1.36、2つ導入された誘導体同士では2.49となり、2つ導入することで完全分離 ( $R_s \geq 1.5$ )を達成することができた。

### 2. CP47,497 分析における PDA および蛍光クロマトグラム

(S)-(-)-DBD-Pro-COCl で CP47,497(注入量あたり 200 pmol)を蛍光誘導体化したときの(A) PDA および(B) 蛍光クロマトグラムを示す (Fig. 4)。いずれのクロマトグラムにおいても、7 min 付近に試薬が1つ導入された誘導体のピークが、16.5 min 付近に試薬が2つ導入された誘導体のピークがそれぞれ2本ずつ観測された。今回分析に用いた CP47,497 標品はラセミ体であり、

(S)-(-)-DBD-Pro-COCl との反応によりそれぞれジアステレオマーを形成する。これにより逆相系の ODS カラムを用いてもジアステレオマー同士を十分に分離することができた。ジアステレオマー同士の  $R_s$  は、試薬が1つ導入された誘導体同士では3.38、2つ導入された誘導体同士では1.91となり、いずれの誘導体においても完全分離を達成することができた。

### 3. カンナビシクロヘキサノール誘導体および CP47,497 誘導体の構造確認

UPLC-FL-ESI-TOF-MS を用いてカンナビシクロヘキサノール誘導体および CP47,497 誘導体の構造確認を行った。

カンナビシクロヘキサノールに試薬が1つ導入された誘導体のマスクロマトグラムおよびマススペクトルを Fig. 5(A)に示す。m/z=655.35 の[M+H]<sup>+</sup>に相当するイオンピークが検出された。カンナビシクロヘキサノールは分子内にフェノール性水酸基とアルコール性水酸基を1つずつ有しているが、(S)-(-)-DBD-Pro-COCl のアシルクロライドはフェノール性水酸基に対する反応性が高く、優先的に前者に導入されたと考えられた。実際、マススペクトルからもそれを支持するフラグメントパターンが得られた。カンナビシクロヘキサノールに試薬が2つ導入された誘導体のマスクロマトグラムおよびマススペクトルを Fig. 5(B)に示す。m/z=976.42 の[M+H]<sup>+</sup>に相当するイオンピークが検出され、マススペクトルからも試薬が導入された誘導体が生成していることが確認できた。

CP47,497 に試薬が1つ導入された誘導体のマスクロマトグラムおよびマススペクトルを Fig. 6(A)に示す。m/z=640.33 の[M+H]<sup>+</sup>に相当するイオンピークが検出された。CP47,497 も分子内にフェノール性水酸基とアルコール性水酸基を1つずつ有しているが、カンナビシクロヘキサノール同様、優先的に前者に導入されたと考えられた。実際、マススペクトルからもそれを支持するフラグメントパターンが得られた。CP47,497 に試薬が2つ導入された誘導体のマスクロマトグラムおよびマススペ

クトルを Fig. 6(B)に示す。m/z=962.40 の[M+H]<sup>+</sup>に相当するイオンピークが検出され、マススペクトルからも試薬が導入された誘導体が生成していることが確認できた。

#### 4. キラル蛍光誘導体化反応の追跡

カンナビシクロヘキサノールおよびCP47,497は、いずれも誘導体化により分子内に試薬が1つあるいは2つ導入された2種類の誘導体を同時に生成した。分析法の定量性向上および頑健性確保のため、誘導体化反応条件を変更させることで誘導体を1種類に収束させるべく最適化を試みた。誘導体化反応時間を0 minから300 minの範囲で変化させたが、全ての条件において誘導体を1種類に収束させることはできなかった。

#### D. 考察

今回確立した誘導体化反応条件では、試薬の導入個数の異なる2種類の誘導体が生成していたため、誘導体を1種類に収束させるべく最適化を試みたが、誘導体を1種類に収束させることはできなかった。今後、2種類の誘導体のうちいずれかの成分を用いてバリデーション(定量性、分析再現性、定量・検出限界)を実施することで、実試料分析にも十分適用可能であると考えられる。

#### E. 結論

近年指定薬物に指定されたカンナビシクロヘキサノール、CP47,497に対する簡便かつ高感度なキラル分析法を開発した。キラル蛍光誘導体化試薬である(S)-(-)-DBD-Pro-COClによる誘導体化を施すことにより、各エナンチオマーを完全分離しつつ両薬物を高感度検出することができた。また、生成した誘導体の構造確認についても行った。今回確立した誘導体化反応条件では、試薬の導入個数の異なる2種類の誘導体が生成していたため、誘導体を1種類に収束させるべく最適化を試みたが、誘導体を1種類に収束させることはできなかった。今後、2種類の誘導体のうちいずれ

かの成分を用いてバリデーション(定量性、分析再現性、定量・検出限界)を実施することで、実試料分析にも十分適用可能であると考えられる。また、今回開発した方法論は、反応性官能基(アミン、フェノール、アルコール)を有する光学活性な違法ドラッグ成分の多くに対しても有用であると考えられ、その適用が期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

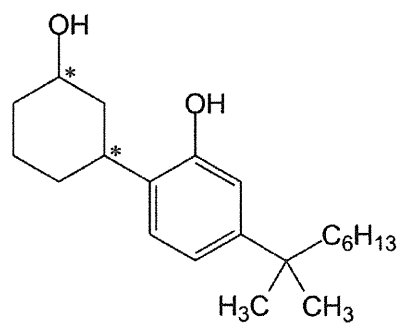
1) Inagaki, S., Hirashima, H., Taniguchi, S., Higashi, T., Min, J. Z., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Toyo'oka, T. Rapid enantiomeric separation and simultaneous determination of phenethylamines by ultra high performance liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometric detection: application to the analysis of illicit drugs distributed in the Japanese market and biological samples. *Drug Testing Analysis*, 2012, in press.

##### 2. 学会発表

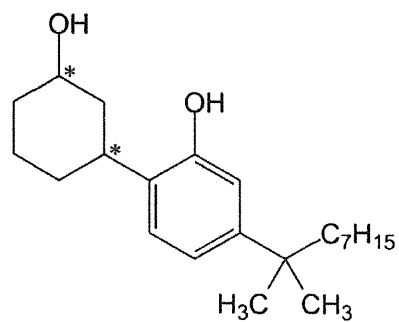
谷口さゆり, 平島晴生, 稲垣真輔, 関 俊哲, 轟木堅一郎, 豊岡利正, 花尻瑠理, 合田幸広: フェネチルアミン系乱用薬物の光学異性体分離分析, 日本分析化学会第60年会, 名古屋 (2011. 9).

#### G. 知的財産所有の取得状況

なし。



CP47,497  
 (1*RS*,3*SR*)-3-[2-Hydroxy-4-(2-  
 methyloctan-2-  
 yl)phenyl]cyclohexan-1-ol



Cannabicyclohexanol  
 (1*RS*,3*SR*)-3-[2-Hydroxy-4-(2-  
 methylnonan-2-  
 yl)phenyl]cyclohexan-1-ol

Fig. 1. Structures of CP47,497 and cannabicyclohexanol.

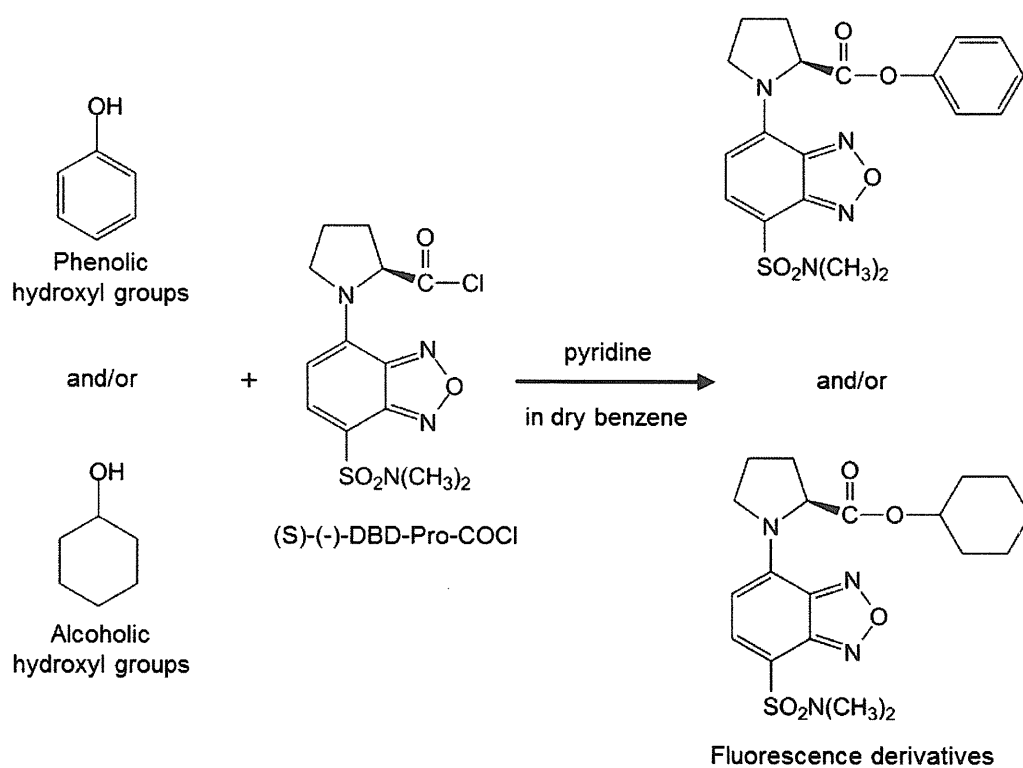


Fig. 2. Fluorescence derivatization for phenolic and alcoholic hydroxyl groups with (S)-(-)-DBD-Pro-COCl.

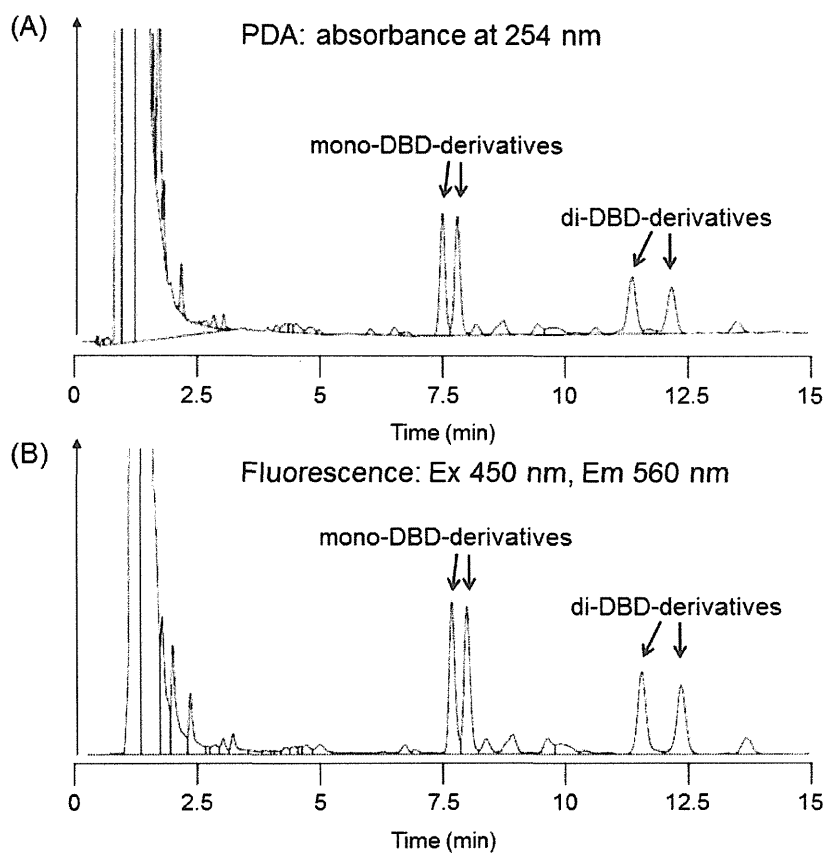


Fig. 3. (A) UHPLC-PDA and (B) UHPLC-FL chromatograms of cannabicyclohexanol derivatized with (S)-(-)-DBD-Pro-COCl.



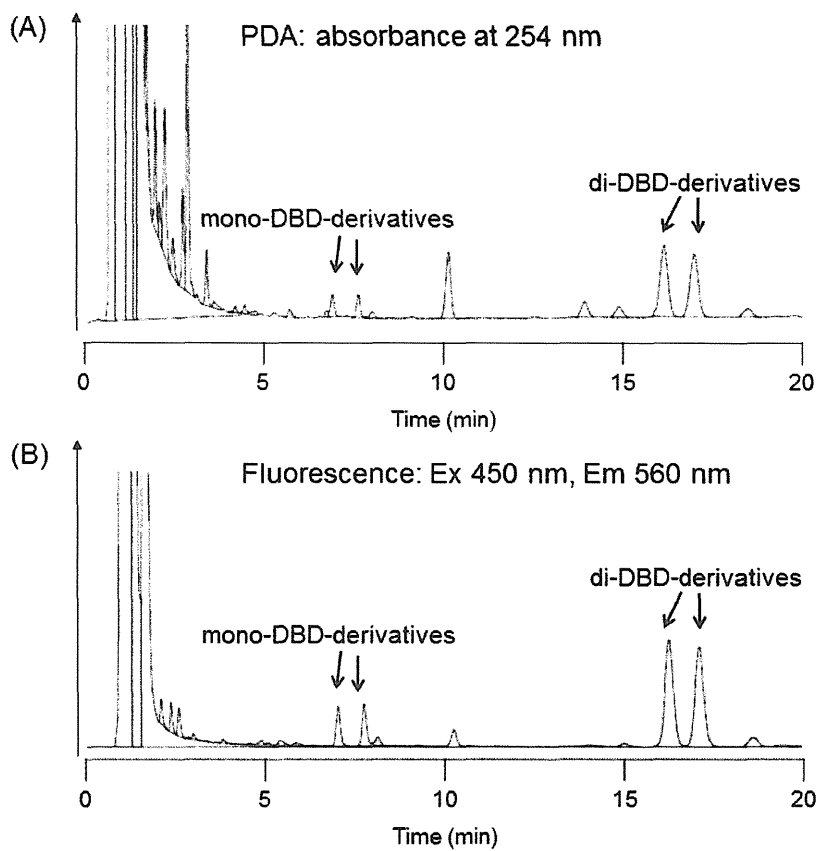


Fig. 4. (A) UHPLC-PDA and (B) UHPLC-FL chromatograms of CP47,497 derivatized with (S)-(-)-DBD-Pro-COCl.

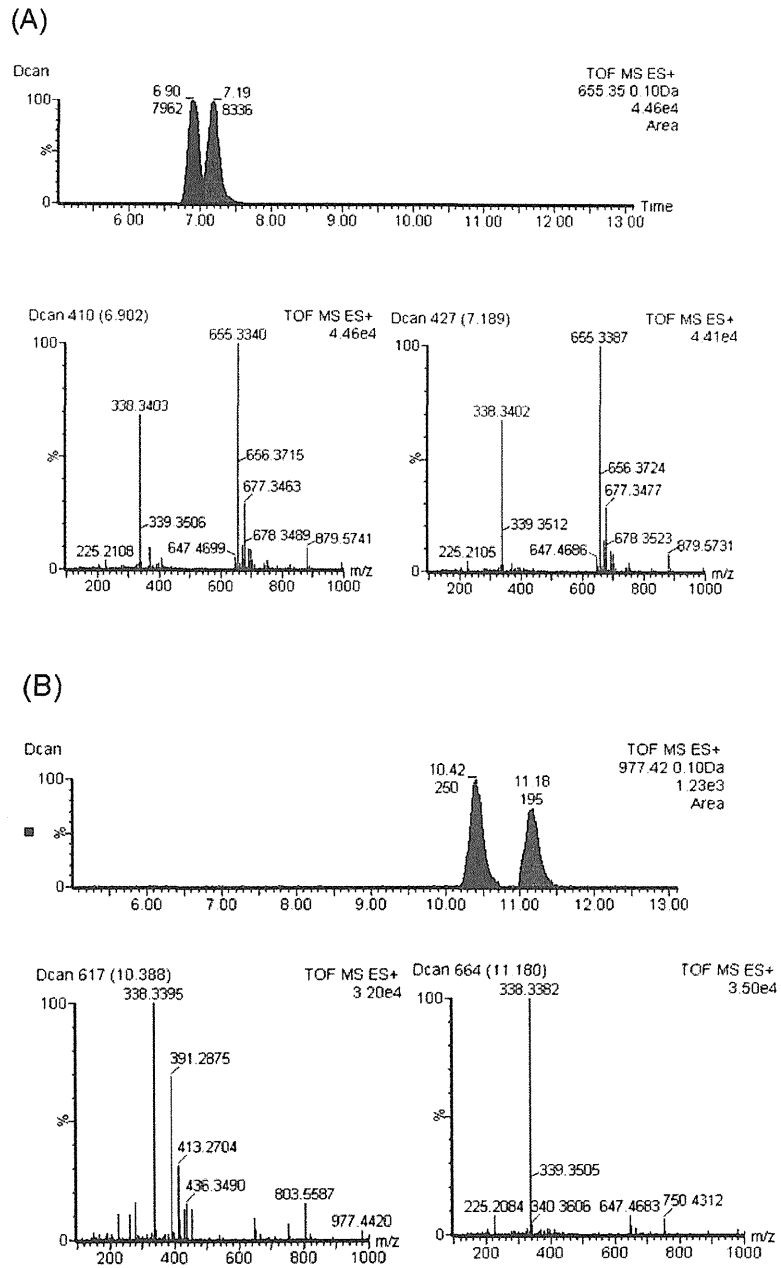


Fig. 5. UPLC-ESI-TOF/MS chromatograms and mass spectra of (A) mono-DBD-derivative, (B) di-DBD-derivative of cannabicyclohexanol.

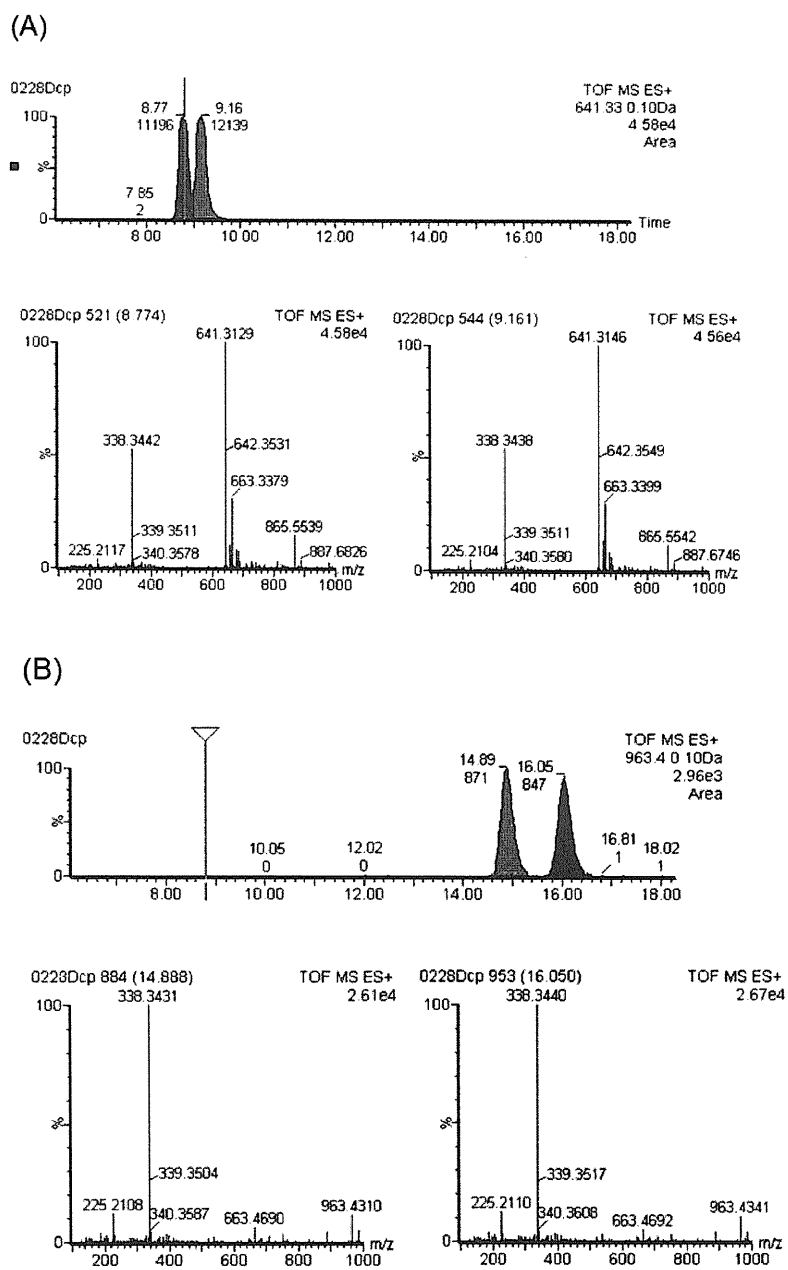


Fig. 6. UPLC-ESI-TOF/MS chromatograms and mass spectra of (A) mono-DBD-derivative, (B) di-DBD-derivative of CP47,497.

分担研究課題:違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究

分担研究者:栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長

### —違法ドラッグ成分の活性評価法の開発—

研究要旨:違法ドラッグを迅速に規制するためにはコンピュータを用いた活性予測が有効である. 本研究ではコンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を開発する. 本年度は新規化合物の活性を予測する目的で, 既知の化合物との構造の類似性に基づいたファーマコファインガープリント法及び 2D-QSAR 法による評価法の検討を行った.

#### A. 研究目的

違法ドラッグが大きな社会問題となっている. そこで, 違法ドラッグを速やかに規制するためには, 違法ドラッグの迅速な評価法が必要である. 本研究では, それら違法ドラッグ類縁薬物のコンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を開発することを目的とする. 本年度はインシリコ評価法(ファーマコファインガープリント法及び 2D-QSAR(定量的活性相関)法)を用いて, 活性未知の新規流通違法ドラッグ成分 4-メチルエトカチノン(Fig.1)について生物活性値の予測を行った.

#### B. 研究方法

4-メチルエトカチノンの生物活性値の予測にはファーマコファインガープリント法及び 2D-QSAR(定量的活性相関)法の2つの方法で行った. いずれも化学計算パッケージ MOE を使った. また, モデル構築のために活性既知類似化学物の活性値としては, (+)-アンフェタミン(1 mg/kg)で弁別したラットを用いて般化試験を行った際の構造類似化合物1~10 の実測活性値(ED<sub>50</sub> 値)を採用した. (Fig.2, Table 1)

(1) ファーマコファインガープリント法

化学構造の類似性のみによる評価法として, フ

ァーマコファインガープリント法による評価を行った. 2点のファーマコファアのグラフ距離で分子の類似性を評価する TGD 法を用いた. 活性の強い化合物 2, 5 をテンプレートとして構造の類似性を算定した. 化学構造の類似性と活性値との相関から4-メチルエトカチノン(11)の活性値を予測した. (Fig.3)

(2) 2D-QSAR(定量的活性相関)法

AutoQuaSAR 法を使って妥当な QSAR モデル式を構築し, 4-メチルエトカチノンの活性値を予測した. QSAR モデル式で用いた記述子は, MOE 上で動作する AutoQuaSAR プログラムによって, MOE に搭載されている 184 のすべての 2D 記述子から選択されたものである. QSAR 式は交差検定の R<sup>2</sup>(相関係数の2乗)が最も良いものを用いた.

#### C. 研究結果

4-メチルエトカチノンの活性の予測を行った. ファーマコファインガープリント法, 2D-QSAR 法によって求めたそれぞれの活性の予測の結果をグラフにまとめた. (Fig.3, 4)

2D-QSAR 法:

相関係数の二乗(R<sup>2</sup>) = 0.84

交差検定の相関係数の二乗(XR<sup>2</sup>) = 0.92

QSAR 式

$pIC50 = 1.40145$

$- 0.0365513 * PEOE\_VSA-0$

$- 0.0848188 * PEOE\_VSA-1$

$- 0.0168429 * SMR\_VSA2$

$+ 0.0168429 * SlogP\_VSA5$

PEOE: The Partial Equalization of Orbital

Electronegativities method of

calculating partial charges

[Gasteiger 1980]

SMR: Molecular refractivity

SlogP: Log of the octanol/water partition  
coefficient

#### D. 考察

既知である類似化合物の活性データの有無がデータの信頼性に大きく係わって来ることが最大の問題点である。4-メチルエトカチノンの2D-QSAR 法による結果は良好とは言えない。

#### E. 結論

麻薬、覚せい剤、指定薬物を含む構造類似化合物 10 化合物の活性(既知)と比較するために、ファーマコフォアフィンガープリント法及び2D-QSAR(定量的活性相関)法の2方法で評価した。4-メチルエトカチノンは、どちらの方法でもこれら規制化合物群と同程度の活性があることが予測された。

#### F. 研究発表等

論文発表

特になし

学会発表

1) 栗原正明, 出水庸介, 佐藤由紀子, 花尻瑠理, 合田幸広; コンピュータシミュレーションによる違法性薬物のレギュレーション, 第55回日本薬学会関東支部大会(2011.10)

2) 栗原 正明、出水 庸介、佐藤 由紀子: コンピューターシミュレーションによる違法ドラッグの活性予測, 日本薬学会第132年会シンポジウム(2012.03, 札幌).

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし.

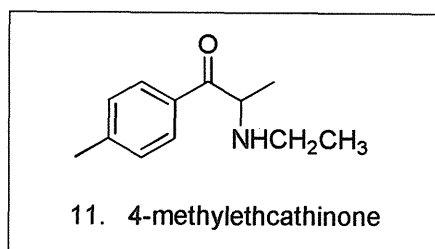


Fig. 1 4-メチルエトカチノンの構造

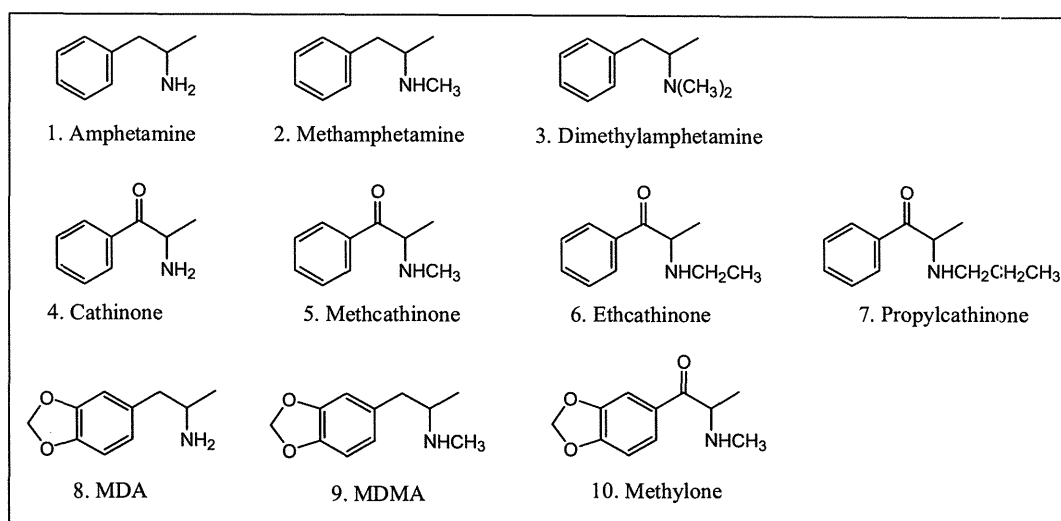


Fig. 2 モデル構築に使用した構造類似化合物の構造

Table 1 構造類似化合物の実測活性値

番号	化合物名	活性実測値 (ED <sub>50</sub> , mg/kg) *
1	Amphetamine (覚せい剤)	0.71
2	(±)-Methamphetamine (覚せい剤)	0.49
3	(+)-Dimethylamphetamine (覚せい剤原料)	2.92
4	(±)-Catinone (麻薬)	0.71
5	(±)-Methcathinone (麻薬)	0.37
6	Ethcathinone (指定薬物)	0.77
7	Propylcathinone	2.03
8	MDA (麻薬)	2.29
9	MDMA (麻薬)	1.64
10	Methylone (麻薬)	2.36

\* T. A. Dal Cason *et al.*, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(4) (1997) 1109-1116.

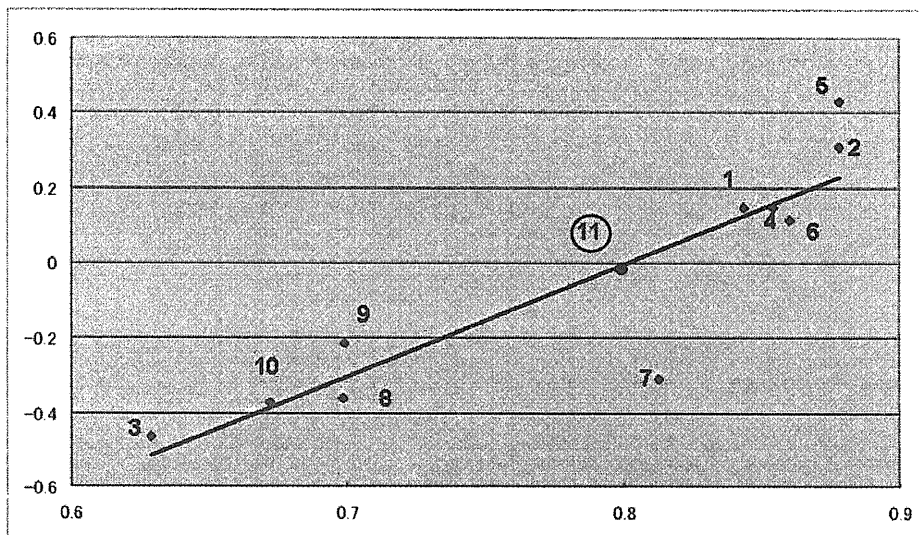


Fig.3 ファーマコフォアフィンガープリント法：縦軸は活性値の対数 (-log 値)、横軸はファーマコフォアフィンガープリント法による構造類似性 (相関係数の二乗  $R^2 = 0.804$ )

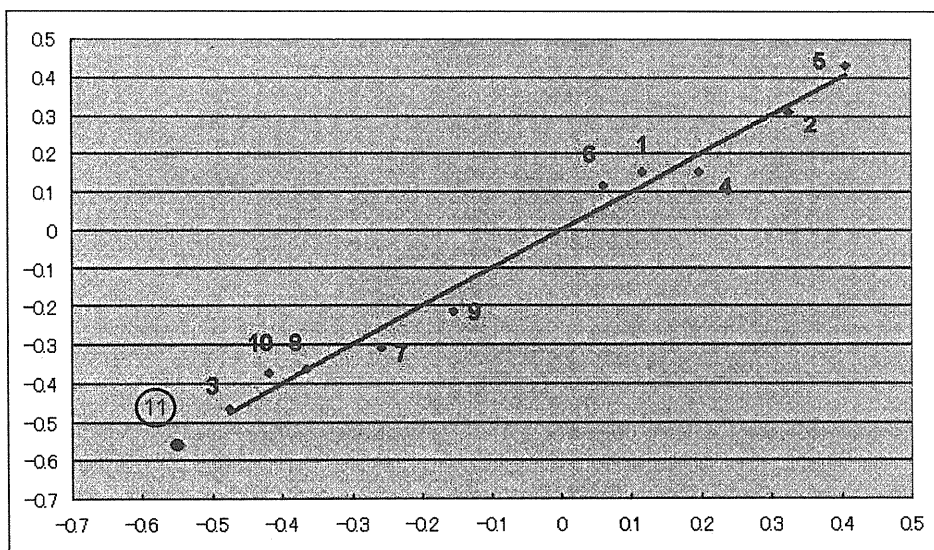


Fig. 4 2D-QSAR 法：縦軸は活性値の対数 (-log 値)、横軸は 2D-QSAR 法による活性予測値

分担研究課題: マウス脳スライス標本を用いた違法ドラッグの薬理作用評価

分担研究者: 関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 部長

—マウス脳スライス標本を用いた違法ドラッグの薬理作用評価—

要旨要旨:違法ドラッグの中枢神経系への作用の蓋然性の高さを迅速に評価し、指定薬物として規制するための科学的根拠を示すことは、薬物乱用による健康上の危害から国民を守るために必須の課題である。本研究では、昨年度構築した脳スライス標本を用いた *in vitro* 機能アッセイ法を用い、合成カンナビノイドが持つ中枢神経系への作用を評価できるか否かを検討する事を目的とした。コントロールとして、合成カンナビノイド WIN55212-2 (1 $\mu$ M) のマウス扁桃体における抑制性応答に対する作用を評価したところ、約 40 % の応答減少が観察された。それゆえ、本手法は違法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドの中枢神経系への作用検討に有用な評価系であると言えよう。今後は、本手法が違法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドを指定薬物として規制する際に、中枢神経系への作用の蓋然性を示す目的で活用される事が期待される。

研究協力者

入江 智彦 国立医薬品食品衛生研究所薬理部  
研究員

#### A. 研究目的

違法ドラッグの中枢神経系への作用の蓋然性の高さを迅速に評価するために、麻薬・大麻・覚醒剤などの乱用薬物の脳内作用機序を基盤とするマウス脳スライス標本を用いた *in vitro* 機能アッセイ法を利用した迅速な違法ドラッグの危害影響予測手法の開発を目的とする。乱用薬物は種々の G タンパク質共役受容体やトランスポーターに作用して神経回路の正常な興奮と抑制の機能バランスを崩す作用を持つ。これに着目し、マウス脳スライス標本を用いたシナプス応答変化を指標とした違法ドラッグの中枢神経系への作用評価系の構築を目的とした。これにより既存の評価法の種々の問題点を解決し、違法ドラッグの中枢神経系への作用を迅速に評価することを可能にする。

本年度は昨年度確立した、カンナビノイド受容

体(CB1)が高密度に発現することが知られている扁桃体神経回路<sup>1)</sup>の光学測定法を用いて、脳スライス標本を用いた生理学実験で汎用される合成カンナビノイド WIN 55212-2 Mesylate<sup>2)</sup>(Fig. 1)の中枢神経系への作用を評価する事を目的とした。

#### B. 研究方法

6-17 週齢の雄マウス(C57BK6/J)を使用した。実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程、及び国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則に従って行った。膜電位のイメージングに使用する厚さ 400  $\mu$ m のマウスの脳スライスをマイクロスライサーにて作製した。スライスの詳細な作成法は以下の通りである。マウスをハロセン(アストラゼネカ)で深麻酔した後、直ちに断頭した。マウス頭部はアルミホイルを被せた氷上に置き、冷却しながらハサミ及びピンセットを用いて頭蓋骨を外して脳を露出し、マウス脳摘出用に改造したスパチュラ



一をもちいて全脳を摘出した。脳は直ちに氷冷した Krebs-Ringer 液中に入れ、5 分間冷却した後、濁いた濾紙上に取り出して、その上で軽く転がすことにより脳表面の硬膜下の薄膜を取り除いた。さらにピンセットを用いて脳表面の血管を取り除いた。脳をブレインマトリクスに背面を下にして入れて、前から5つ目のレーン、後ろから5つ目のレーンの2か所で冠状断にし、末端部分を取り除いて脳ブロックとした。氷冷しておいたスライサーのチャンバーの台の水滴を拭き取り、脳ブロックを瞬間接着剤で張り付けた。スライサーの刃と脳を挟んで反対側に、脳ブロックに接するように1cm 角の寒天を瞬間接着剤で貼り付けた。スライサーにチャンバーをとりつけ、脳ブロックが全て没するようにチャンバー内を Krebs-Ringer 液で満たし、スライス中は混合ガスでバブリングした。切りだしたスライスは灌流チャンバーに収まる大きさにするため、顕微鏡観察下でカミソリを用いて、スライスの扁桃体周辺部を取り除いてから、次のステップに用いた。スライスをインターフェース型リザーバーの濾紙上へ移し、混合ガスと Krebs-Ringer 液により酸素供給と保湿を行った。混合ガスでバブリングした Krebs-Ringer 液で膜電位感受性色素である Di-4-ANEPPS を溶かして染色液(10  $\mu\text{M}$ )とし、ピペットを用いてスライスに染色液を丁寧にかけた。インターフェース型リザーバー内のリングに染色液を満たし、その上に脳スライスを乗せた濾紙を被せた。アルミホイルで遮光し、室温で5分間静置し、染色した。その後スライスを濾紙ごと Krebs-Ringer 液の上に置き、1時間以上静置した後実験に使用した。

インターフェース型リザーバー、サブマージ型リザーバー、メディウム瓶に Krebs-Ringer 液を入れ、混合ガスでバブリングした。メディウム瓶は恒温槽で 30°C 程度に温め、水流ポンプにつないだ。水流ポンプ、吸引ポンプを動かし、落射型光学実体顕微鏡のチャンバーの灌流を開始した。灌流が正常に行われていることを確認したら一度灌流を止め、チャンバーにスライスを入れて、チャンバー

下面のストッキングに張り付けた。その後灌流を再開し、スライスに同心円電極を刺し、水面の揺れを抑えるために液面にカバーガラスを置いた。

扁桃体における電気刺激で誘発される膜電位変化の広がり調べのために、扁桃体の外側部を走行する外包の様々な部位に同心円型刺激電極を挿入して電気刺激を行った(強さ;10~50  $\mu\text{A}$ 、持続時間 200  $\mu\text{sec}$ )。スライス内の神経細胞集団の応答は、落射式蛍光顕微鏡(MVX-10;オリンパス)と CMOS センサーを搭載した光量差分増幅カメラシステム(ULTIMA;ブレインビジョン)で撮影した。撮影は1 msecごとに行い、合計1024フレームを記録した。これを20秒ごとに5回行い、加算平均したものをデータとして用いた。神経応答による膜電位変化は光量変化として捉えた。記録開始時の蛍光量を100%として、刺激等による蛍光量変化を単位%で測定し、疑似カラーで、脱分極方向の変化を緑色から赤色で表現し、過分極方向の変化を青色から紫色で表現した(Fig. 2)。

抑制性の応答が計測可能な大きさで誘発される刺激電流の強さを調べ、スライス毎に刺激電流の強さを決定した。電気刺激に対するスライス内の神経細胞応答を観察し、LAの中心部付近の画素で記録されている波形の上向き成分(興奮性応答)と下向き成分(抑制性応答)の振幅の大きさ(Fig. 2)を測定し、20分間振幅が安定したことを確認し、その大きさの平均値を100%として薬物の作用を評価した。薬物、WIN55212-2(WIN; 1  $\mu\text{M}$ )を含む Krebs-Ringer 液に切り替えて灌流し、30分間スライス応答の変化を記録した。その後灌流液を、再び薬物を含まない Krebs-Ringer 液に戻し、20分間スライス応答の変化を記録した。

抑制性の応答に対する薬物の作用を観察する実験では、刺激電極を扁桃体外包の中心核側に刺した。まず、20分間応答の大きさが安定していることを確認した後、灌流液を、AP5(50  $\mu\text{M}$ )及び CNQX(10  $\mu\text{M}$ )を含む Krebs-Ringer 液に変更し、電気刺激によってスライス内に抑制性応答誘発さ

れ、かつ反応の大きさが安定していることを確認した。AP5 及び CNQX を含む灌流液のボトルに WIN の 10 mM DMSO 溶液を終濃度 1  $\mu$ M になるように加え、30 分間応答変化を記録した。その後灌流液を、AP5、CNQX、WIN を含まない Krebs-Ringer 液に戻し、20 分間スライス応答の変化を記録した。

薬物の作用を計測する領域の決定は、次の通りに行った。薬物の投与前 5 フレーム(10 分間)を平均化した(Fig. 3A)。次に、薬物投与終了前後 5 フレーム(10 分間)を平均化した(Fig. 3B)。そして投与後と投与前の平均画像から差分を計算した(Fig. 3C)。得られた差分画像を K=6 でクラスター分類し、投与前後で変化のあった領域を特定した(Fig. 3D)。クラスター分類によって特定した領域内画素の平均波形を取得した(Fig. 3E)。波形の大きさの測定は、平均波形を用いて行った。興奮性応答は最大値をしめず連続する 3 フレームの平均を採用した。一方抑制性応答には、刺激後 300~349 フレームの平均を用いた。

### C. 研究結果

同一スライス上の扁桃体外包の様々な位置を電気刺激したところ、LA 領域で発生した神経応答波形と、刺激から 300 msec 後の画像は刺激位置によって異なった(Fig. 2)。最も大きな反応が発生した場所が扁桃体入り口付近の外包である(Fig. 2A)。刺激により、LA 領域全体において 500 ミリ秒以上続く抑制性応答が観察された。

マウスの扁桃体スライス標本を使用し WIN の作用を調べる実験において、薬物の投与前 5 フレーム(10 分間)を平均化した(Fig. 4A)。次に、WIN 投与開始 25 分~35 分の 5 フレーム(10 分間)を平均化した(Fig. 4B)。それらの差分データは Fig. 5C に示す。WIN の作用部位は、LA 領域に限局していた(Fig. 4D)。

Fig. 5A には、WIN の作用の経時変化を示した。WIN の投与 10 分以降で作用が見え始めた。投与開始後 25 分~35 分の興奮性応答と抑制性応

答への作用を比較した(Fig. 5B)。抑制性応答の強さが、投与前  $106.3 \pm 9.03\%$  (mean  $\pm$  SEM ; n=7) から投与後  $45.7 \pm 8.47\%$  (n=7) に有意に減少した ( $P < 0.0001$ )。興奮性応答の強さも  $98.0 \pm 3.22\%$  (n=7) から投与後  $84.3 \pm 4.48\%$  (n=7) に有意に減少した ( $P = 0.0034$ ) が、抑制性応答の減少に比べるとその程度は小さかった。また、WIN 投与後に washout を行ったが、応答波形は元に戻らなかった。

また、マウスの扁桃体スライス標本を使用した実験において、CNQX、AP5 の投与で興奮性入力を抑えた上で抑制性応答のみが観察されることを確認し、WIN の作用を調べる実験を行った。薬物の投与前 5 フレーム(10 分間)を平均化した(Fig. 6A)。WIN 投与開始 25 分~35 分の 5 フレーム(10 分間)を平均化した(Fig. 6B)。それらの差分データを Fig. 6C に示す。興奮性入力の有る場合と同様に WIN の作用部位は、LA 領域に限局していた(Fig. 6D)。

Fig. 7A には、WIN の作用の経時変化を示した。興奮性入力の有る場合と同様に WIN の投与 10 分以降で作用が認められた。WIN を投与したことにより、LA 領域において抑制性応答の強さが、投与前  $97.3 \pm 3.11\%$  (n=11) から投与後  $35.3 \pm 7.65\%$  (n=11) に有意に減少した ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 7B)。この実験の結果から、WIN は抑制性伝達を抑制する作用を持つことが明らかとなった。WIN 投与後に washout を行ったが、抑制性の応答波形は元に戻らなかった。一部の実験においては、最後に TTX を投与し、残った反応が神経活動由来であることを確認した。

### D. 考察

今年度は、昨年度確立した評価系を用いて合成カンナビノイドの中樞神経系への作用の評価を行った。脳部位の刺激方法を、グルタミン酸受容体阻害剤を灌流液に入れずに行う方法(Fig. 4,5)と、入れて行う場合(Fig. 6,7)の二通りで行った。阻害剤有りで扁桃体を電気刺激すると、興奮

性応答と抑制性応答が混ざった複雑な膜電位応答が生じた (Fig. 4)。一方、阻害剤無しで行った場合は、比較的単純な抑制性応答の波形のみが生じた (Fig. 6)。この応答の変化を指標として合成カンナビノイドの薬効を評価することが出来たので (Fig. 7)、グルタミン酸受容体を阻害した条件下で行う方が膜電位応答への影響を評価しやすいと言える。

医薬品などで化合物の持つ中枢神経系への作用を検討する場合、ラットなどの動物を用いた行動実験で評価する場合が一般的である。例えば、ラットの行動実験で合成カンナビノイド Cannabicyclohexanol (CCH) の中枢神経系への作用を評価する場合、ラット 1 匹あたり約 750  $\mu\text{g}$  も投与する必要がある<sup>3)</sup>。一方、今回の *in vitro* 実験で用いた合成カンナビノイドの化合物量は 1 実験当たり約 50  $\mu\text{g}$  と少量で行うことが可能であった。この事より、本研究で用いた手法は、従来の動物の行動実験を用いた方法と比較して鋭敏な評価系であると言えよう。この点は、特に合成カンナビノイド化合物を大量に用意できない際に有用である。

また、本手法で合成カンナビノイドの中枢神経系への作用を検討する場合、CB1 受容体を介しているか否かを検討する場合には、合成カンナビノイドで誘発される変化が、CB1 受容体の拮抗剤 (AM-251 等) でキャンセルされる事を確認する必要がある。

今後は、合成カンナビノイドに対する応答の用量反応関係が測定可能か否かを検討すると同時に、指定薬物として既に規制されている CCH の評価を行うことで、本評価系の合成カンナビノイド系違法ドラッグの評価系としての有用性を確認する必要がある。

#### E. 結論

昨年度確立した、マウス脳切片と光学的測定法を組み合わせた膜電位応答記録法により、今

年度は合成カンナビノイドの中枢神経系への作用を薬効評価できる事を示した。今後はこの評価系を、違法ドラッグから検出された合成カンナビノイドの中枢神経系への作用検討に用いる事で、指定薬物として規制する為の科学的根拠を示し、迅速に法規制へと繋げる事に貢献できると考えられる。

#### F. 参考文献

- 1) Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. *The Journal of neuroscience* (2001) 21: 9506-9518.
- 2) Yoshida T, Hashimoto K, Zimmer A, Maejima T, Araishi K, Kano M *The Journal of neuroscience* (2002) 22(5):1690-1697.
- 3) Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Matsumoto N, Huang ZL, Goda Y, Urade Y Effects of synthetic cannabinoids on electroencephalogram power spectra in rats. *Forensic Sci Int* (2012) 215(1-3):179-183.

#### G. 研究発表

特になし

#### H. 知的所有権の取得状況

特になし

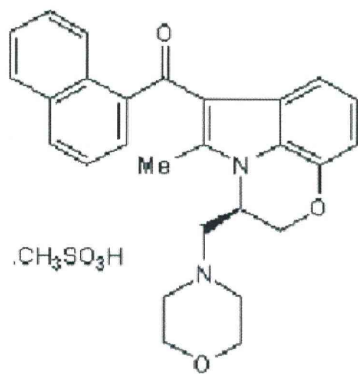


Fig. 1: WIN 55212-2 Mesylate の構造式

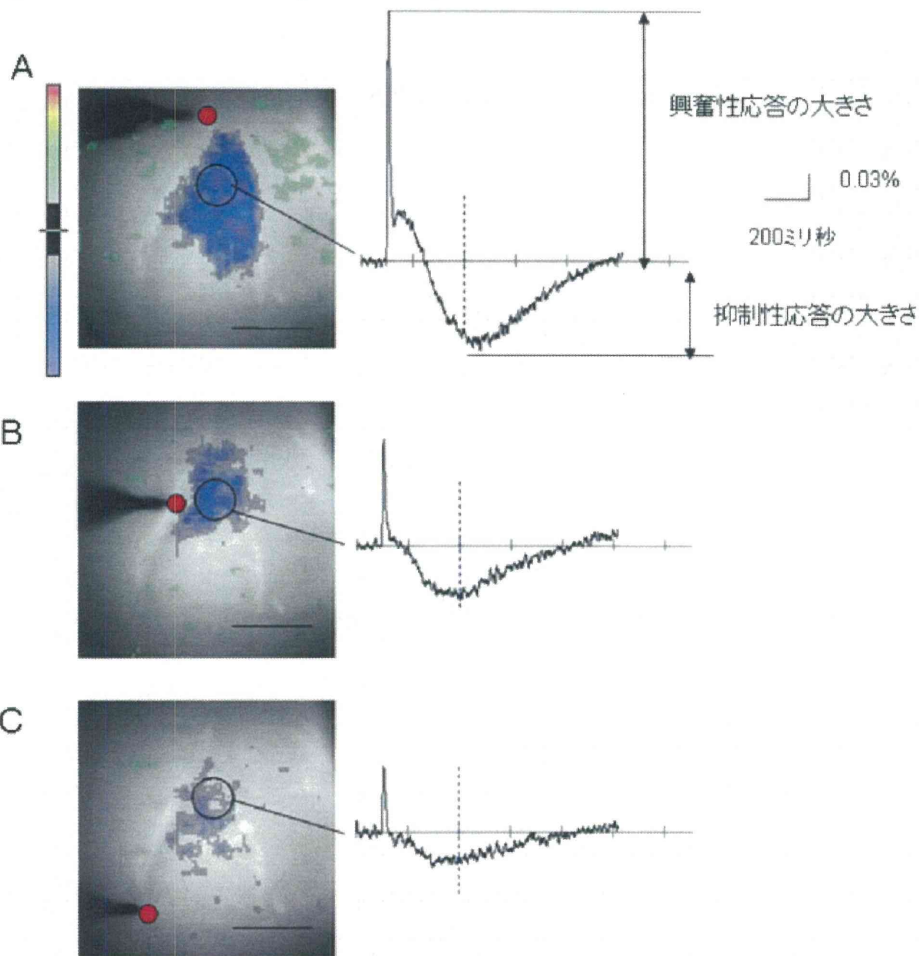


Fig. 2: 同一スライス上の電気刺激部位と応答パターンの関係

異なる刺激位置で引き起こされた扁桃体 LA 領域の神経応答波形と、刺激より 300 ミリ秒後の画像。刺激位置を赤丸、波形取得領域を中抜き丸で示した。スケールバー: 500  $\mu\text{m}$

- A. 扁桃体外包入り口付近の刺激時
- B. 扁桃体外包の中ほど(外側)刺激時
- C. 扁桃体外包の下部(外側)刺激時