

201132023A-B

平成 23 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

平成 23 年度 研究報告書
平成 21-23 年度 総合研究報告書

平成 24 年 3 月

研究代表者：船田正彦

平成 23 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

平成 23 年度 研究報告書
平成 21-23 年度 総合研究報告書

平成 24 年 3 月

研究代表者：船田正彦

目次

平成 21～23 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) (課題番号: H21-医薬一般-031)

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

I. 平成 23 年度 総括研究報告書	
船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	1
II. 平成 23 年度 分担研究報告書	
研究-1: 脱法ハーブ含有合成カンナビノイドの薬物依存性および細胞毒性の評価	12
船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	
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	24
青尾直也 (国立精神・神経医療研究センター)	
研究-3: 違法ドラッグの早期神経細胞毒性の簡易迅速評価	37
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)	
研究-4: クラブユーザーにおける MDMA 等の	50
クラブドラッグ乱用実態に関する研究	
嶋根卓也 (国立精神・神経医療研究センター)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	68
IV. 平成 21～23 年度 総合研究報告書 [3 年間のまとめ]	
船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	71
V. 平成 21～23 年度 分担研究報告書 [3 年間のまとめ]	
研究-1: 合成カンナビノイドの精神神経薬理学特性並びに薬物依存性の解析	78
船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	
研究-2: 違法ドラッグの薬物弁別刺激特性: カンナビノイド誘導体の評価	84
富山健一 (国立精神・神経医療研究センター)	
研究-3: 違法ドラッグによる神経毒性および神経障害性の発現に関する検討	89
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)	
研究-4: 違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)の乱用実態把握に関する研究	101
嶋根卓也 (国立精神・神経医療研究センター)	
VI. 3 年間の研究成果の刊行に関する一覧表	106

平成 21 - 23 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)
(課題番号 : H21-医薬一般-031)

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

平成 23 年度 研究報告書

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、覚せい剤と類似構造を有する物質や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の流通とその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を中心に、精神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: 脱法ハーブ含有合成カンナビノイドの薬物依存性および細胞毒性の評価] 合成カンナビノイド 4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210) および (4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (RCS-4) について、その精神依存性を中心に行動薬理学的特性並びに細胞毒性について検討した。1) 行動薬理学的解析: JWH-210、RCS-4 投与により、カタレプシー様無動状態が誘発された。また、体温下降が誘発された。この効果はカンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬の前処置により抑制された。2) 報酬効果: 薬物の報酬効果は、conditioned place preference (CPP)法により評価した。JWH-210、RCS-4 の条件付け (1日1回6日間) により、有意な CPP の発現が確認された。条件付けによって報酬効果が発現したことから、JWH-210 および RCS-4 は精神依存形成能を有することが示唆された。3) 細胞毒性: NG108-15 細胞を使用し、薬物処置 5 時間後、死細胞由来プロテアーゼ遊離を指標に細胞毒性の発現を検討した。JWH-210 および RCS-4 処置により、濃度依存的に細胞毒性が惹起された。また、Annexin V 陽性細胞が観察されたことから、アポトーシス様の細胞死が惹起される可能性が示唆された。本研究より、合成カンナビノイドである JWH-210 および RCS-4 は報酬効果を示し、精神依存形成能を有することが明らかになった。また、JWH-210 および RCS-4 は、カンナビノイド CB_1 受容体を介して、大麻成分である Δ^9 -THC と類似した中枢神経作用を発現する可能性が高く、乱用される危険性が極めて高いものと推測された。さらに、JWH-210 および RCS-4 は培養細胞に対して毒性を示すことから、乱用により脳神経系に影響を及ぼし健康被害の発生が危惧される。[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] 薬物弁別実験: 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)、および 2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentylindol-3-yl)ethanone (JWH-203)、JWH-210、RCS-4 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、弁別刺激効果発現に対するカンナビノイド受容体拮抗薬の前処置の影響について検討した。1) Δ^9 -THC の般化試験: CP-55,940 により訓練を行い、CP-55,940 弁別獲得動物を獲得した。 Δ^9 -THC の般化試験を行った結果、 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。2) 合成カンナビノイドの般化試験: CP-55,940、JWH-203、JWH-210 の弁別刺激効果は、 CB_1 受容体拮抗薬

SR-141,716 前処置により抑制された。合成カンナビノイド CP-55,940、JWH-203 および JWH-210 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：違法ドラッグの早期神経細胞毒性の簡易迅速評価] 培養神経細胞を用いての暴露早期のミトコンドリアでの酸化ストレスの検出の簡易性、感度および有用性を検証するために、フェネチルアミン系の違法ドラッグ「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I をモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞へ比較的低濃度添加し、暴露早期における神経細胞毒性、形態学的変化ならびに活性酸素種に対する蛍光指示薬を用いたミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した。比較的低濃度(50, 100, 250 μ M)の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I を B65 細胞に 3 時間暴露した。添加 3 時間後においては、250 μ M 2C-I で細胞質内の空胞化を伴う形態変化がみられた他は、顕著な形態変化は認められなかった。しかし、2CT-7, 2CT-2, 2C-I の 3 時間暴露では低濃度(50 μ M)から既に細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成の有意な亢進がみられた。形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の暴露早期においても、「2C シリーズ」のなかでも 2CT-7, 2CT-2, 2C-I がセロトニン系神経細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした。「2C シリーズ」の共通骨格が、モノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられる。また、本検討で用いた培養神経細胞株と蛍光指示薬を用いての酸化ストレスの検出法は、低濃度のドラッグの暴露早期における細胞障害性を迅速かつ感度良く、しかも定量的に評価できる方法として有用であると思われる。[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] クラブイベントやレイブパーティに関連した MDMA 中毒症例が複数報告されている一方で、クラブ利用者層における乱用状況は未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、クラブ利用者層における MDMA 等クラブドラッグの薬物乱用状況を把握することを目的とした。関東地方 2 店舗のクラブで開催された計 4 回のイベントにて実態調査を実施した。会場入口にて計 420 枚のエントリーカード（調査参加券）を配布し、会場内に設営された調査ブースにてノートパソコンを用いた無記名調査を実施し、237 名より回答を得た（回収率 56.4%）。重複回答者および回答不備を除く 208 名（男性 60.1%）を分析対象とし、以下の知見を得た。対象者の中心は 20 代（73.1%）、高学歴者（大学卒業以上 55.3%）であった。生涯経験率は、大麻 32.7%、MDMA 9.1%、LSD 8.2%、コカイン 5.8%、ケタミン 3.8%であった。過去 1 年経験率は、大麻 20.0%、LSD 2.9%、コカイン 2.9%、覚せい剤 1.9%であった。現在の乱用状況をより強く反映している過去 1 年経験率によれば、クラブ利用者層においては大麻が最も使用され、MDMA よりも LSD やコカインが流行している可能性が示唆される。クラブ利用者層に向けた薬物乱用・依存の予防介入が求められる。

合成カンナビノイドである JWH-210 および RCS-4 の行動薬理学特性を検討した。これらの薬物は精神依存形成能および 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 CPP 試験および薬物弁別試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性および自覚効果を評価できることが確認された。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、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「2C シリーズ」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、違法ドラッグの精神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。また、

実態調査の結果から、クラブ利用者層においては大麻が最も使用され、MDMAに加えてLSDやコカインも乱用されている実態が明らかになった。クラブ利用者層に向けた薬物乱用・依存の予防介入が求められる。

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：和田 清

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
研究員

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)、5-(1,1-dimethyl-octyl)-2-(3-hydroxy-cyclohexyl)-phenol (CP-47,497-C8)、1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole (JWH-018)、4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210) および (4-methoxyphenyl) (1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (RCS-4)等が検出されている。

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

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、薬物の精神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 -tetrahydrocannabinol (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。合成カンナビノイドである CP-55,940、CP-47,497、CP-47,497-(C8)、JWH-210 および RCS-4 について、薬物依存性の解析では、報酬効果を評価する conditioned place preference (CPP) 法の有用性を検討する。また、多くの類似構造化合物の中樞作用を、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する。細胞毒性の評価では、培養細胞を利用する解析を行う。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。本研究では、合成カンナビノイドおよび覚せい剤類似化合物の精神依存性、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。

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。

現在までに、クラブイベントやレイブパー

ティに関連した MDMA 中毒症例が複数報告されている。そこで、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、クラブ利用者層を対象に、違法ドラッグを含む MDMA 等クラブドラッグの薬物乱用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: 脱法ハーブ含有合成カンナビノイドの薬物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
依存性薬物研究室長

乾燥した植物片に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を混在させたいわゆる“脱法ハーブ”の乱用が大きな社会問題になっている。本研究では、脱法ハーブより検出された合成カンナビノイド 4-ethyl-naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210) および (4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (RCS-4) について、その精神依存性を中心に行動薬理学的特性並びに細胞毒性について検討した。1) 行動薬理学的解析：JWH-210、RCS-4 投与により、カタレプシー様無動状態が誘発された。また、体温下降が誘発された。この効果はカンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬の前処置により抑制された。2) 報酬効果：薬物の報酬効果は、conditioned place preference (CPP) 法により評価した。JWH-210、RCS-4 の条件付け (1日1回6日間) により、有意な CPP の発現が確認された。条件付けによって報酬効果が発現したことから、JWH-210 および RCS-4 は精神依存形成能を有することが示唆された。3) 細胞毒性：NG108-15 細胞を使用し、薬物処置 5 時間後、死細胞由来プロテアーゼ遊離を指標に細胞毒性の発現を検討した。JWH-210 および RCS-4 処置により、濃度依存的に細胞毒性が惹起さ

れた。また、Annexin V 陽性細胞が観察されたことから、アポトーシス様の細胞死が惹起される可能性が示唆された。本研究より、合成カンナビノイドである JWH-210 および RCS-4 は報酬効果を示し、精神依存形成能を有することが明らかになった。また、JWH-210 および RCS-4 は、カンナビノイド CB₁ 受容体を介して、大麻成分である Δ⁹-THC と類似した中枢神経作用を発現する可能性が高く、乱用される危険性が極めて高いものと推測された。さらに、JWH-210 および RCS-4 は培養細胞に対して毒性を示すことから、乱用により脳神経系に影響を及ぼし健康被害の発生が危惧される。

[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

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)、2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentylindol-3-yl) ethanone (JWH-203)、4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210)、2-(4-methoxyphenyl)-1-(1-pentyl-indol-3-yl)methanone (RCS-4)について、それぞれの薬物弁別刺激効果を解析し、Δ⁹-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) Δ⁹-THC の般化試験: CP-55,940 弁別獲得動物を用いて、Δ⁹-THC (0.1-3 mg/kg)の般化試験を行った。Δ⁹-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 SR-141,716 (1 mg/kg)を前処置した動物に、CP-55,940 (0.1 mg/kg)、JWH-203 (1 mg/kg)、JWH-210 (1 mg/kg)を投与し般化試験を行った。その結果、CB₁ 受容体拮抗薬 SR-141,716 において CP-55,940、JWH-203 および JWH-210 の弁別刺激効果が有意に抑制された。このことから、合成カンナビノイド誘導体 CP-55,940、JWH-203 および JWH-210 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、Δ⁹-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。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。さらに、違法ドラッグである合成カンナビノイド誘導体は、Δ⁹-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: 違法ドラッグの早期神経細胞毒性の簡易迅速評価]

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

培養神経細胞を用いての暴露早期のミトコンドリアでの酸化ストレスの検出の簡易性、感度および有用性を検証するために、2C-C や T-2C-H 以外の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I をモノアミン系セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞へ比較的低濃度添加し、

暴露早期における神経細胞毒性、形態学的変化ならびに活性酸素種に対する蛍光指示薬を用いたミトコンドリアでの活性酸素種生成について検討した。結果：これまでの「2C シリーズ」の B65 細胞への 24 時間暴露による LDH 放出量の IC₅₀ 値：T-2C-H (100 μM) > 2CT-7 (150 μM)、2C-I (150 μM) > 2CT-2 (250 μM) > 2CT-4 (300 μM)、2C-C (350 μM) を参考にして、まず用量および暴露時間の設定を行い、比較的 low 濃度 (50, 100, 250 μM) の「2C シリーズ」2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I を B65 細胞に 3 時間暴露した。添加 3 時間後においては、250 μM 2C-I で細胞質内の空胞化を伴う形態変化がみられた他は、顕著な形態変化は認められなかった。しかし、2CT-7, 2CT-2, 2C-I の 3 時間暴露では low 濃度 (50 μM) から既に細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成の有意な亢進がみられた。結論：形態変化がほとんどみられない比較的 low 濃度の暴露早期においても、「2C シリーズ」のなかでも 2CT-7, 2CT-2, 2C-I がセロトニン系神経細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした。「2C シリーズ」のうち、とくに 2CT-7, 2CT-2, 2C-I がセロトニン系神経細胞に対して神経細胞死を惹起する強い細胞毒性を発揮するというこれまでの検討結果をあわせると、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」の共通骨格が、モノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられる。また、本検討で用いた培養神経細胞株と蛍光指示薬を用いての酸化ストレスの検出法は、low 濃度のドラッグの暴露早期における細胞障害性を迅速かつ感度良く、しかも定量的に評価できる方法として有用であると思われる。

[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]
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

研究員

クラブイベントやレイブパーティに関連した MDMA 中毒症例が複数報告されている一方で、クラブ利用者層における乱用状況は未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、クラブ利用者層における MDMA 等クラブドラッグの薬物乱用状況を把握することを目的とした。関東地方 2 店舗のクラブで開催された計 4 回のイベントにて実態調査を実施した。会場入口にて計 420 枚のエントリーカード（調査参加券）を配布し、会場内に設営された調査ブースにてノートパソコンを用いた無記名調査を実施し、237 名より回答を得た（回収率 56.4%）。重複回答者および回答不備を除く 208 名（男性 60.1%）を分析対象とし、以下の知見を得た。対象者の中心は 20 代（73.1%）、高学歴者（大学卒業以上 55.3%）であった。生涯経験率は、大麻 32.7%、MDMA 9.1%、LSD 8.2%、コカイン 5.8%、ケタミン 3.8% であった。過去 1 年経験率は、大麻 20.0%、LSD 2.9%、コカイン 2.9%、覚せい剤 1.9% であった。現在の乱用状況をより強く反映している過去 1 年経験率によれば、クラブ利用者層においては大麻が最も使用され、MDMA よりも LSD やコカインが流行している可能性が示唆される。MDMA 使用者においては、薬物使用に伴う健康被害も報告されていることから、クラブ利用者層に向けた薬物乱用・依存の予防介入が求められる。

C. 考察

1. 合成カンナビノイドの精神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 JWH-210 および RCS-4 は報酬効果を示し、精神依存形成能を有することが明らかになった。また、JWH-210 および RCS-4 は、カンナビノイド CB₁ 受容体を介して、大麻成分である Δ⁹-THC と類似した中枢神経作用を発現する可能性が高く、乱用される危険性が極めて高いものと

推測された。さらに、JWH-210 および RCS-4 は培養細胞に対して毒性を示すことから、乱用により脳神経系に影響を及ぼし健康被害の発生が危惧される。本研究より、合成カンナビノイド誘導体について、薬物による中枢興奮もしくは抑制作用の発現用量を参考に conditioned place preference (CPP) 法による試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できることが確認された。細胞毒性については、NG108-15 細胞を使用し、簡便かつ高感度に細胞毒性の発現を評価できることが明らかになった。

2. 合成カンナビノイドの薬物弁別試験

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、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。

3. 神経細胞毒性発現に関する研究

フェネチルアミン系の違法ドラッグ「2C シリーズ」は形態変化がほとんどみられない比較的 low 濃度の暴露早期においても、セロトニン系神経細胞内、とくにミトコンドリアでの活性酸素種生成を亢進させることを明らかにした。2CT-7, 2CT-2, 2C-I がセロトニン系神経細胞に対して神経細胞死を惹起する強い細胞毒性を発揮するというこれまでの検討結果をあわせると、フェネチルアミン系違法ドラッグの「2C シリーズ」の共通骨格が、モノアミン系セロトニン含有神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられる。また、本検討で用いた培養神経細胞株と蛍光指示薬を用いた酸化ストレスの検出法は、低濃度のドラッグの暴露早期における細胞障害性を迅速かつ感度

良く、しかも定量的に評価できる方法として有用であると思われる。

4. クラブ利用者における違法ドラッグに関する実態調査

本研究では、クラブ利用者層における MDMA 等クラブドラッグの薬物乱用状況を把握することを目的とした。現在の乱用状況をより強く反映している過去 1 年経験率によれば、クラブ利用者層においては大麻が最も使用され、MDMA よりも LSD やコカインが流行している可能性が示唆される。MDMA 使用者においては、薬物使用に伴う健康被害も報告されていることから、クラブ利用者層に向けた薬物乱用・依存の予防介入が求められる。

D. 結論

合成カンナビノイドである JWH-210 および RCS-4 の行動薬理学特性を検討した。これらの薬物は、精神依存形成能と麻薬である Δ^9 -THC と類似の自覚効果を有することが明らかになった。これらの合成カンナビノイド誘導体については、大麻と同様に乱用される可能性が高いと考えられる。

薬物弁別試験法では、評価対象の薬物が示す自覚効果と規制薬物が示す自覚効果の類似性を評価できることから、多くの類縁誘導体が存在する合成カンナビノイド誘導体の中枢作用の解析に有用であることが示唆された。また、合成カンナビノイド誘導体の毒性の評価については、培養細胞を利用した検討は、迅速かつ高感度の毒性評価法として有効であることが判明した。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、その有用性は高いと考えられる。

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、違法ドラッグの精神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。

クラブ利用者層においては大麻が最も使用され、MDMA よりも LSD やコカインが流行している可能性が示唆された。MDMA 使用者においては、薬物使用に伴う健康被害も報告されていることから、クラブ利用者層に向けた薬物乱用・依存の予防介入が求められる。違法ドラッグの身体的な健康被害や、法的規制のみならず、大麻等の薬物乱用の先にある薬物依存や慢性中毒症状についても正しく理解させることが薬物乱用防止の上で重要だと思われる。

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精神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) K. Tomiyama, M. Funada. Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in "Spice" products: the role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicol Lett.* 207(1): 12-17, 2011.
- 2) 和田 清, 嶋根卓也, 船田正彦. わが国における薬物乱用・依存の最近の特徴. *日本社会精神医学会雑誌* 20(4): 407-414, 2011.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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*, 214: 923-931, 2011.
- 6) Takeshima, M., Murata, M., Urasoe, N., Murakami, S., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Kita, T.: Protective effects of baicalein against excess L-DOPA-induced dopamine quinone neurotoxicity. *Neurol. Res.*, 33: 1050-1056, 2011.
- 7) Ogawa, D., Asanuma, M., Miyazaki, I., Tachibana, H., Wada, J., Sogawa, N., Sugaya, T., Kitamura, S., Maeshima, Y., Shikata, K. and Makino, F.: High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp. Diabetes Res.*, 2011:534872, 2011.
- 8) 嶋根卓也：思春期における薬物乱用の実態と対策，*産婦人科治療* 103(2),144-150,2011.
- 9) 嶋根卓也：思春期における薬物乱用の実態と予防，*思春期学* 29(1),13-18,2011.
- 10) 嶋根卓也：薬剤師から見た向精神薬の過量服薬，*精神科治療学* 27(1),87-93,2012.
- 11) 松本俊彦、嶋根卓也、尾崎茂、小林桜児、和田清：乱用・依存の危険性の高いベン

ゾジアゼピン系薬剤同定の試み、精神医学 54(2);201-209,2012.

2. 学会発表

- 1) 船田正彦、富山健一、和田 清. 薬物依存性および毒性の評価法：合成カンナビノイドの特性. 第1回レギュラトリーサイエンス学会学術大会. 東京. 9月3日. 2011.
- 2) M. Funada, K. Tomiyama, N. Aoo, K. Wada, Discriminative properties and cytotoxicities of cannabinoid receptor agonist CP 55,490. 73th Annual Meeting - College on Problems of Drug Dependence. June 18-23, 2011. Florida, USA.
- 3) 富山健一, 和田 清, 船田正彦. JWH-203 および JWH-210 の弁別刺激特性並びに細胞毒性の評価. 第46回日本アルコール・薬物医学会. 愛知県産業労働センター. 名古屋. 2011.10.13.
- 4) 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： $\alpha 7$ ニコチン受容体 agonist の扁桃体注入は 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を抑制する. 第84回日本薬理学会年会, 横浜, 2011.3.22.
- 5) 田中健一, 園田佳奈子, 浅沼幹人： α -synuclein 神経毒性における L-buthionine-SR-sulfoximine の作用に関する検討. 第84回日本薬理学会年会, 横浜, 2011.3.23.
- 6) 林 宏美, 土居真穂, 尾上由華, 鋤塚圭子, 小山敏広, 四宮一昭, 宮崎育子, 浅沼幹人, 北村佳久：ACTH 反復投与ラットにおける海馬細胞新生の減少に対する imipramine, lithium の作用に関する検討. 第84回日本薬理学会年会, 横浜, 2011.3.24.
- 7) 林 宏美, 土居真穂, 尾上由華, 鋤塚圭子, 三宅綾香, 小山敏広, 四宮一昭, 宮崎育子, 浅沼幹人, 北村佳久：ACTH 反復投与ラットにおける海馬細胞新生の減少およびそのメカニズムに関する検討. 日本薬学会第131年会 学生シンポジウム, 静岡, 2011.3.29.
- 8) 浅沼幹人, 竹島美香, 村上真樹, 三好 耕, 宮崎育子：L-DOPA によるドーパミン神経細胞増殖作用と 3-OMD の抑制効果におけるアストロサイトの関与. 第52回日本神経学会総会, 名古屋, 2011.5.20.
- 9) 三好 耕, 笠原恭輔, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人：非シナプス性の神経伝達を1次繊毛が媒介する可能性について. 第33回日本生物学的精神医学会, 東京, 2011.5.22.
- 10) 笠原恭輔, 三好 耕, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人：ドーパミン伝達がニューロンの1次繊毛に及ぼす影響. 第33回日本生物学的精神医学会, 東京, 2011.5.22.
- 11) 浅沼幹人：覚せい剤の取り込みと神経毒性. 日本法中毒学会第30年会 シンポジウム「薬物代謝能力の変動/個人差と乱用薬物の作用・毒性」, 長崎, 2011.6.10.
- 12) 宮崎育子, 村上真樹, 竹島美香, 三好 耕, 浅沼幹人：腸管神経叢ニューロンおよびグリアに対するロテノン暴露の影響. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.15.
- 13) 村上真樹, 宮崎育子, 竹島美香, 三好 耕, 浅沼幹人：ロテノン慢性投与パーキンソン病モデルにおける腸管神経叢ニューロンおよびグリアの変化. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.15.
- 14) 三好 耕, 笠原恭輔, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人：ドーパミン受容体は非シナプス性の神経伝達装置である神経細胞1次繊毛に局在する. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9.17.
- 15) 浅沼幹人, 村上真樹, 宮崎育子：L-DOPA の初代培養ドーパミン神経保護効果およびそれに対する 3-OMD の抑制作用はアストロサイトを標的としている. 第54回

- 日本神経化学会大会, 加賀市, 2011,9.26.
- 16) 宮崎育子, 村上真樹, 浅沼幹人: 線条体アストロサイトに取り込まれた L-DOPA の利用効率. 第 54 回日本神経化学会大会, 加賀市, 2011,9.26.
 - 17) 浅沼幹人, 村上真樹, 宮崎育子: ロテノン曝露の腸管神経叢における神経およびグリア細胞への影響. 第 5 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 品川, 2011.10.7.
 - 18) 浅沼幹人, 宝田剛志, 中川貴之, 成田 年, 小泉修一, 宮崎育子: スタディグループ 3. 「神経精神疾患の治療標的としてのアストロサイト」第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2011.10.27.
 - 19) 浅沼幹人, 村上真樹, 竹島美香, 三好 耕, 宮崎育子: アストロサイトに取り込まれた L-DOPA およびドパミンの代謝に関する検討. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2011.10.27.
 - 20) 喜多大三, 竹島美香, 三島頭人, 宮崎育子, 浅沼幹人: 培養グリア細胞系におけるメタンフェタミンによる細胞毒性発現. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2011.10.27.
 - 21) 笠原恭輔, 三好 耕, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人: ドーパミン伝達系とニューロンの 1 次繊毛の関係. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2011.10.28.
 - 22) 三好 耕, 笠原恭輔, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人: 非シナプス性の神経伝達装置である神経細胞 1 次繊毛はドーパミン受容体を発現する. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京, 2011.10.29.
 - 23) Kitamura, Y., Ishida, S., Kawasaki, Y., Asanuma, M., Koyama, T., Matsunaga, H., Sendo, T., Araki, H., Kawasaki, H.: Effects of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist injected into the amygdala on naloxone-induced place aversion in rats following a single exposure to morphine. 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, 2011.11.13.
 - 24) Kuwatsuka, K., Onoue, Y., Hayashi, H., Doi, M., Koyama, T., Miyazaki, I., Asanuma, M., Kitamura, Y.: Effects of imipramine and lithium on the suppression of cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus in ACTH-treated rats. 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, 2011.11.16.
 - 25) Koyama, T., Hayashi, H., Kuwatsuka, K., Onoue, Y., Doi, M., Miyazaki, I., Asanuma, M., Kitamura, Y.: Effects of electroconvulsive stimuli on neurogenesis in dentate gyrus of ACTH-treated rats. 41th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, 2011.11.16.
 - 26) 宮崎育子, 村上真樹, 竹島美香, 浅沼幹人: ロテノン曝露パーキンソン病モデルの腸管神経叢における神経障害およびグリア細胞の関与. 第 64 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 2011.11.20.
 - 27) 竹島美香, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人: L-テアニンのアストログリアでのグルタチオン増加を介したドパミン神経保護効果. 第 64 回日本薬理学会西南部会, 福岡, 2011.11.20.
 - 28) 浅沼幹人, 宮崎育子: アストロサイトの抗酸化機構を標的とした神経保護. 第 9 回神経科学研究会, 東京, 2011.11.26.
 - 29) 村上真樹, 宮崎育子, 十川紀夫, 浅沼幹人: ロテノン暴露パーキンソン病モデルの腸管神経叢での神経障害とメタロチオネインの関与. メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011,

名古屋, 2011.12.8.

特になし

- 30) 嶋根卓也、日高庸晴：クラブカルチャーとの親和性と MDMA 使用との関連. 第 70 回日本公衆衛生学会総会、秋田、2011.10.19-21.

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

平成 23 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

脱法ハーブ含有合成カンナビノイドの薬物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）

【研究要旨】乾燥した植物片に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を混在させたいわゆる“脱法ハーブ”の乱用が大きな社会問題になっている。本研究では、脱法ハーブより検出されている合成カンナビノイド 4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210)および(4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (RCS-4)について、その精神依存性を中心に行動薬理学的特性並びに細胞毒性について検討した。

1) 行動薬理学的解析：JWH-210、RCS-4 投与により、カタレプシー様無動状態が誘発された。また、体温下降が誘発された。この効果はカンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬の前処置により抑制された。2) 報酬効果：薬物の報酬効果は、conditioned place preference (CPP)法により評価した。JWH-210、RCS-4 の条件付け（1日1回6日間）により、有意な CPP の発現が確認された。条件付けによって報酬効果が発現したことから、JWH-210 および RCS-4 は精神依存形成能を有することが示唆された。3) 細胞毒性：NG108-15 細胞を使用し、薬物処置 5 時間後、死細胞由来プロテアーゼ遊離を指標に細胞毒性の発現を検討した。JWH-210 および RCS-4 処置により、濃度依存的に細胞毒性が惹起された。また、Annexin V 陽性細胞が観察されたことから、アポトーシス様の細胞死が惹起される可能性が示唆された。

本研究より、合成カンナビノイドである JWH-210 および RCS-4 は報酬効果を示し、精神依存形成能を有することが明らかになった。また、JWH-210 および RCS-4 は、カンナビノイド CB_1 受容体を介して、大麻成分である Δ^9 -THC と類似した中枢神経作用を発現する可能性が高く、乱用される危険性が極めて高いものと推測された。さらに、JWH-210 および RCS-4 は培養細胞に対して毒性を示すことから、乱用により脳神経系に影響を及ぼし健康被害の発生が危惧される。

A. 研究目的

薬物乱用は若年層を中心に浸透しているのが現状であり、大麻および麻薬として規制されている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)の乱用などは、依然大きな社会問題である。

近年、乾燥した植物片に合成カンナビノイ

ドが混ざってあるいわゆる“脱法ハーブ”が世界的に流通しており、その乱用が深刻な問題となっている¹⁾。我が国では、この脱法ハーブは「ハーブショップ」などの店舗を装い、「お香」と称して販売されているケースが多い。実際は、乱用を目的として購入されているのが現状である。都内ではこうした脱法ハーブを販売する店舗数が一昨年から 45 倍以

上に急増しているとされている²⁾。全国的にこうした脱法ハーブ販売店が急増しており、脱法ハーブの乱用によって、呼吸困難や意識混濁等の健康被害が多発しており、深刻な状況である。

脱法ハーブに含まれる化学物質として、大麻と類似の作用を示す合成カンナビノイドが検出されている^{3,4)}。こうした合成カンナビノイドの依存性や毒性を評価し、適切に規制するための科学データを収集することが急務である。

本研究では、国内で流通している脱法ハーブより検出されている合成カンナビノイド JWH-210 および RCS-4 について、その精神依存性を中心に行動薬理学的特性並びに細胞毒性について検討した。脱法ハーブや脱法ドラッグの含有化学成分の特性を迅速にスクリーニングするために、行動変化に着目した「行動薬理学的マーカー」の同定は有用である。

本研究では、脱法ハーブ等の製品における合成カンナビノイドの含有を予測するために、合成カンナビノイドによる行動薬理学的マーカーの同定を試みた。

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、(-)-cis-3-[2-Hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)-phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol (CP-55,940, Cayman Chem, Ann Arbor, MI, USA)、4-ethylnaphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-210) および (4-methoxyphenyl) (1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone (RCS-4, Research Chemical Supplier, San Clemente, CA, USA) (Fig. 1) を使用した。カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬としては、N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251)、5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichloro-

phenyl)-4-methyl-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) 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 (AM 630) を使用した。

1. 合成カンナビノイドの運動活性及び体温に対する影響

JWH-210、RCS-4 および CP-55,940 により誘発される無動状態は、パーテストにより測定した。直腸体温は、デジタル温度計(SANWA, TH3 型)を用いて測定した。対照群は溶媒である 0.4% DMSO 含有生理食塩液を投与した。

2. JWH-210, RCS-4 の精神依存性評価

報酬効果の評価には、conditioned place preference (CPP) 法を用いた。白黒 2 区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、JWH-210 もしくは RCS-4 を 1 日おきに投与し、30 分間装置内に閉じ込め、6 日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である 0.4% DMSO 含有生理食塩液を投与し、薬物および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした (Table 1)。テストセッションは、7 日目に薬物および溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 1. 薬物条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎：薬物、○：溶媒、T：テスト (薬物、溶媒ともに処置せず)

3. JWH-210, RCS-4 による細胞毒性

樹立安定細胞株である NG108-15 細胞 (5000 cells/well) を使用し、JWH-210 もしくは RCS-4 添加 5 時間後の影響を検討した。対照群は溶媒である 0.1% DMSO を処置した。細胞毒性は CytoTox-Glo™ 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。アポトーシスの検出には、Apoptosis/Necrosis Detection kit (Enzo Life Sciences) を使用し、Annexin V もしくはヨウ化プロピディウム (PI) 標識細胞を蛍光顕微鏡により解析した。また、実体顕微鏡による細胞形態の変化について観察を行った。

C. 研究結果

1. 合成カンナビノイドの運動活性及び体温に対する影響

JWH-210 処置により、用量依存的にカタレプシー様無動状態が誘発された(Fig. 2A)。同様に、直腸体温の下降が観察された(Fig. 2C)。JWH-210 (5 mg/kg) 投与によるこれらの効果は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (1 mg/kg) の前処置により有意に抑制された (Fig. 2B, C)。

RCS-4 処置により、用量依存的にカタレプシー様無動状態が誘発された(Fig. 3A)。同様に、直腸体温の下降が観察された(Fig. 3B)。RCS-4(30 mg/kg)によるこれらの効果は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により有意に抑制された (Fig. 3C, D)。

代表的カンナビノイド受容体作用薬である CP-55,940 処置により、カタレプシー様無動状態が誘発され、この効果はカンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により有意に抑制された (Fig. 4A)。同様に、直腸体温の下降が観察され、この効果もカンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により有意に抑制された (Fig. 4B)。

2. JWH-210, RCS-4 の精神依存性評価

マウスを使用し conditioned place preference (CPP) 法による精神依存性の評価を行った。JWH-210 もしくは RCS-4 の条件付けによって CPP の発現、すなわち報酬効果の発現が認められた(Fig. 5)。

3. JWH-210, RCS-4 による細胞毒性

NG108-15 細胞において、JWH-210(10-30 μ M) 処置により、濃度依存的に細胞毒性が惹起された(Fig. 6A)。JWH-210 の 20 μ M および 30 μ M において有意な効果が確認された。JWH-210 (30 μ M) の毒性の発現は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 SR141716A の前処置により有意に抑制された。一方、カンナビノイド CB₂ 受容体拮抗薬 AM630 の前処置では毒性の発現は抑制されなかった(Fig. 6B)。Annexin V 陽性細胞の解析を行ったところ、JWH-210 (30 μ M) により、Annexin V 陽性細胞の著明な増加が認められた(Fig. 6C)。

RCS-4(0.3-30 μ M) 添加 5 時間後、濃度依存的に細胞毒性が惹起された(Fig. 7A)。RCS-4 の 10 μ M および 30 μ M において有意な効果が確認された。また、30 μ M の高濃度では、細胞体の萎縮と凝集が生じていた (Fig. 7B)。

D. 考察

本研究では、脱法ハーブより検出された合成カンナビノイド JWH-210 および RCS-4 の行動薬理学的特性に関する解析を行った。JWH-210 および RCS-4 の投与によって、カタレプシー様無動状態および体温下降が発現した。これらの薬理作用は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬で抑制されることから、カンナビノイド CB₁ 受容体を介して発現することを確認した。また、代表的カンナビノイド受容体作用薬である CP-55,940 によっても、同様にカタレプシー様無動状態および体温下降が発現し、これらの作用は、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明らかになった。これらの結果から、脱法ハーブの抽出物投与による動物実験において、カタレプシー様無動状態および体温下降が観察される場合、合成カンナビノイドが混在する可能性が推測される。確定試験として、これらの効果に対するカンナビノイド受容体拮抗薬の影響を検討し、作用が抑制される場合は合成カンナビノイドが混在することが確定で

きると考えられる。こうした、「無動状態」および「体温下降」といった行動薬理的マーカーは、詳細な物質同定のための一次スクリーニングとして有用である。

マウス CPP 法により、合成カンナビノイド JWH-210 および RCS-4 の報酬効果を解析した。JWH-210 および RCS-4 の条件付けにより、有意な報酬効果の発現が確認された。したがって、JWH-210 および RCS-4 は、精神依存形成能を有する可能性が示唆された。

薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性から、中枢興奮作用が発現する用量付近から低用量側で報酬効果が発現することが判明している^{5,6)}。本研究において JWH-210 および RCS-4 の「無動状態」および「体温下降」が発現する用量の 1/5 から 1/10 の低用量の条件付けで、報酬効果の発現が確認された。したがって、合成カンナビノイドの精神依存性を評価する場合は、「無動状態」の発現用量を参考に CPP 試験を行うことにより、報酬効果を効率良く解析できると考えられる。

合成カンナビノイドの JWH-210 および RCS-4 の無動状態、体温下降および報酬効果の発現強度は JWH-210 > RCS-4 であった。JWH-210 および RCS-4 の GTP γ S 結合実験によるカンナビノイド受容体に対する活性化強度は、JWH-210 > RCS-4 であり⁴⁾、行動薬理学マーカーの発現強度は、カンナビノイド受容体の活性化強度と相関性が認められた。したがって、合成カンナビノイドの依存性や毒性の推測には受容体に対する親和性の強度が利用できることが明らかになった。

最後に、合成カンナビノイド暴露による細胞毒性の発現について検討した。樹立安定株である NG108-15 細胞を使用して、JWH-210 および RCS-4 について検討したところ、細胞毒性の発現が確認された。同様に、合成カンナビノイド暴露により、Annexin V 陽性細胞が検出されたことから、これらの合成カンナビノイドはアポトーシスを惹起す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惹起することから、乱用により、深刻な

健康被害が発生する恐れがあるものと推察された。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。

合成カンナビノイドは、精神依存形成能を有し、細胞毒性等の有害作用を惹起する可能性があるため、その乱用の拡大には特に注意を要すると考えられる。

E. 結論

本研究から、合成カンナビノイドである JWH-210 および RCS-4 は精神依存形成能を有し、乱用される危険性が極めて高いと考えられる。さらに、細胞毒性を惹起することから、乱用により、深刻な健康被害が発生する恐れがあるものと推察された。

こうした一連の評価システムにより、国内で流通が確認されている違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）の精神依存性および神経毒性の検討を行い、危険化合物の迅速な発見に活用できると考えられる。また、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。

本研究から、合成カンナビノイド JWH-210 および RCS-4 は大麻と類似した作用を発現する可能性があり、乱用される危険性が極めて高く、麻薬などの規制薬物として指定する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Hu X, Primack BA, Barnett TE, Cook RL.: College students and use of K2: an emerging drug of abuse in young persons. *Subst Abuse Treat Prev Policy.* 6:16, 2011.
- 2) 脱法ハーブ：都内、2年で2→9 3店舗に急増／トラブル深刻化し死者も. 産経新聞 2月27日(月)朝刊, 2012.

- 3) Nakajima J, Takahashi M, Seto T, Kanai C, Suzuki J, Yoshida M, Hamano T.: Identification and quantitation of two benzoylindoles AM-694 and (4-methoxyphenyl) (1-pentyl-1H-indol-3-yl) methanone, and three cannabimimetic naphthoylindoles JWH-210, JWH-122, and JWH-019 as adulterants in illegal products obtained via the Internet. *Forensic Toxicol* 29: 95-110, 2011.
- 4) Nakajima J, Takahashi M, Nonaka R, Seto T, Suzuki J, Yoshida M, Kanai C, Hamano T.: Identification and quantitation of a benzoylindole (2-methoxyphenyl) (1-pentyl-1H-indol-3-yl) methanone and a naphthoylindole 1-(5-fluoropentyl-1H-indol-3-yl)-(naphthalene-1-yl) methanone (AM-2201) found in illegal products obtained via the Internet and their cannabimimetic effects evaluated by in vitro [³⁵S]GTP γ S binding assays. *Forensic Toxicol* 29: 132-141, 2011.
- 5) 船田 正彦: 条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価:基礎と応用. *日本薬理学雑誌* 126: 10-16, 2005.
- 6) 船田正彦: MDMA および 5-MeO-DIPT 精神依存性評価とその形成メカニズムの解明. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P4-14, 2004.
- synthetic cannabinoids found in "Spice" products: the role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicol Lett.* 207(1): 12-17, 2011.
- 2) 和田 清, 嶋根卓也, 船田正彦. わが国における薬物乱用・依存の最近の特徴. *日本社会精神医学会雑誌* 20(4): 407-414, 2011.
2. 学会発表
- 1) 船田正彦, 富山健一, 和田 清. 薬物依存性および毒性の評価法: 合成カンナビノイドの特性. 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会. 東京. 9 月 3 日. 2011.
- 2) M. Funada, K Tomiyama, N Aoo, K. Wada, Discriminative properties and cytotoxicities of cannabinoid receptor agonist CP 55,490. 73th Annual Meeting - College on Problems of Drug Dependence. June 18-23, 2011. Florida, USA.
- 3) 富山健一, 和田 清, 船田正彦. JWH-203 および JWH-210 の弁別刺激特性並びに細胞毒性の評価. 第 46 回日本アルコール・薬物医学会. 愛知県産業労働センター. 名古屋. 2011.10.13.

H. 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Tomiyama, M. Funada. Cytotoxicity of