

201205009A

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金
(特別研究事業)

培養細胞系を用いた未規制合成カンナビノイド
の乱用危険性推測に関する研究

課題番号 : H24-特別-指定-012

平成 24 年度 研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者 : 船田正彦

目次

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金
(特別研究事業：H24-特別-指定-012) 研究報告書

培養細胞系を用いた未規制合成カンナビノイドの 乱用危険性推測に関する研究

I. 平成 24 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 24 年度 研究報告書		
研究-1：合成カンナビノイドの行動薬理学的特性	-----	8
船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)		
研究-2：カンナビノイド受容体機能の解析	-----	17
船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)		
研究-3：培養細胞を利用した合成カンナビノイドの検出	-----	29
船田正彦 (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	-----	36

培養細胞系を用いた未規制合成カンナビノイドの 乱用危険性推測に関する研究

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。その中でも脱法ハーブの流通拡大は深刻である。脱法ハーブに含まれる化学物質としては、合成カンナビノイドが主流である。この合成カンナビノイドは 100 種類以上の存在が知られており、特定の化学物質が規制されるとその類似構造を有する別の化学物質が登場する悪循環が続いている。合成カンナビノイドの薬物依存形成にはカンナビノイド受容体が関与しており、脳内に多く存在するカンナビノイド CB_1 受容体の重要性が示されている。本研究では、合成カンナビノイドの行動薬理作用発現における CB_1 受容体の役割について検討した。また、 CB_1 受容体が安定して発現した培養細胞を利用して、合成カンナビノイドの機能評価を行い、 CB_1 受容体に対する作用強度と行動薬理作用および細胞毒性との関連性について検討した。培養細胞を利用して、合成カンナビノイドの機能解析を迅速に行うための評価システムの構築を試みた。

【研究-1：合成カンナビノイドの行動薬理学的特性】

本研究では 10 種類の合成カンナビノイドについて、行動薬理学的特性を解析した。

1. (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol (CP-55,940)
2. 5-(1,1-dimethylheptyl)-2-(3-hydroxycyclohexyl) phenol (CP-47,497)
3. (1-pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenyl-methanone (JWH018)
4. (1-butyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenyl-methanone (JWH-073)
5. (4-methyl-1-naphthalenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-122)
6. 2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-ethanone (JWH-203)
7. (4-ethyl-1-naphthalenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-210)
8. [2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenyl-methanone, methanesulfonate ((±)-WIN 55,212)
9. [1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-1-naphthalenyl-methanone (AM-2201)
10. [1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl](4-methyl-1-naphthalenyl)-methanone (MAM-2201)

1) 行動薬理学的解析：10 種類の合成カンナビノイドによる運動活性および体温に対する影響を検討した。すべての合成カンナビノイドにより、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様

に、体温下降作用の発現が確認された。これらの効果は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、CB₁ 受容体が関与することが明らかになった。合成カンナビノイドの無動状態および体温下降の発現と、CB₁ 受容体に対する親和性強度に関する相関性を検討したところ、正の相関(無動状態: $r=0.789$, 体温下降: $r=0.853$)が認められた。

[研究-2：カンナビノイド受容体機能の解析]

流通している脱法ハーブ製品より検出されている合成カンナビノイドに着目し、カンナビノイド CB₁ 受容体発現細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用して、合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用を解析した。合成カンナビノイドの添加により、細胞内 Ca²⁺が増加した。この効果は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。流通している脱法ハーブに含まれる合成カンナビノイドは、主に CB₁ 受容体作用薬であることが明らかになった。

[研究-3：培養細胞を利用した合成カンナビノイドの検出]

流通している脱法ハーブ製品を検査対象として、CB₁ 受容体発現細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用して、合成カンナビノイドの混在について検査を実施した。17 種類の脱法ハーブ製品から DMSO にて成分を抽出した。抽出成分を CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞に添加したところ、細胞内 Ca²⁺が増加し、CB₁ 受容体作用薬の混在が確認された。

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の行動薬理学的特性に関する解析を行った。合成カンナビノイドの投与によって、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、CB₁ 受容体拮抗薬で抑制されることから、CB₁ 受容体を介して発現することを確認した。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」といった行動薬理学的マーカーは、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。

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した評価は、脱法ハーブ製品中の合成カンナビノイド、特に、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用であることが確認された。CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した評価は、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、迅速かつ高感度の検出法として有用である。

本研究のカンナビノイド CB₁ 受容体に対する作用強度を解析する評価システムは、違法ドラッグの中枢作用および有害作用発現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。

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。

最近の問題としては、平成 24 年 1 月以降表面化した「脱法ハーブ」と称される製品の流通拡大である。その乱用による健康被害が多数発生し、救急搬送される事例が増大した。脱法ハーブは乾燥した植物片に精神作用を示す薬物が混ぜ込まれており、この混在する薬物を乱用しているのが現状である。現在のところ、検出される化学物質の多くは、合成カンナビノイドである事が判明している。世界的には、合成カンナビノイドは、「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。

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-dimethyloctyl)-2-(3-hydroxycyclohexyl)phenol (CP-47,497-C8)、(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenyl-methanone (JWH-018)、(1-butyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenyl-methanone (JWH-073)、(4-methyl-1-naphthalenyl)-(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-122)、2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-ethanone (JWH-203)、(4-ethyl-1-naphthalenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-210)、[1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-1-naphthalenyl-methanone (AM-2201)、[1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl](4-methyl-1-naphthalenyl)-methanone (MAM-2201)などが検出されている。この合成カンナビノイドは少なくとも 100 種類以上の類縁体の存在が知られており、特定の薬物を規制しても、次々に新しい薬物が登場する状況が続いている。

こうした状況を打破するためには、合成カンナビノイドの構造に着目し、類似したものを一括で規制するいわゆる「包括指定」が有効であると考えられる。この包括指定を実施する上で、合成カンナビノイドの機能解析を迅速に行うためのシステム構築が急務となっている。動物実験による検討では、1 対象薬物でおよそ 3 ヶ月程度の解析期間が必要である。そこで、この時間をできる限り短縮し、かつハイスループットシステムにより、多数のサンプルを解析できる一次評価法の導入が必須となる。合成カンナビノイドにおける薬

物依存形成には、カンナビノイド受容体が関与しており、脳内に多く存在する CB₁ 受容体の重要性が示されている。実際に乱用されている合成カンナビノイドは、CB₁ 受容体に作用するものが多数であり、その作用が強いほど乱用される傾向にある。そこで、CB₁ 受容体に対して作用する強度を検査する事ができれば、合成カンナビノイドの乱用危険性を推測できる可能性がある。

本研究では、合成カンナビノイドの行動薬理作用発現における CB₁ 受容体の役割について検討した。また、CB₁ 受容体が安定して発現した培養細胞を利用して、合成カンナビノイドの機能評価を行い、CB₁ 受容体に対する作用強度と行動薬理作用および細胞毒性との関連性について検討した。合成カンナビノイドによる有害作用の解析を迅速に行うために、CB₁ 受容体をターゲットにした培養細胞による機能評価システムの構築を試みた。

B. 各研究の目的、方法、結果

[研究-1: 合成カンナビノイドの行動薬理学的特性]

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

大麻と類似の作用を示す合成カンナビノイドが、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、未規制の合成カンナビノイドは多数存在していることから、行動薬理学的的手法を用いた危険性を推測するスクリーニング法の確立が必要である。

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 10 種類 (CP-55,940、CP-47,497、CP-47,497-C8、JWH018、JWH-073、

JWH-122、JWH-203、JWH-210、AM-2201、MAM-2201) による運動活性および体温に対する影響を検討した。すべての合成カンナビノイドにより、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これらの効果は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、CB₁ 受容体が関与することが明らかになった。合成カンナビノイドの無動状態および体温下降の発現と、CB₁ 受容体に対する親和性強度に関する相関性を検討したところ、正の相関(無動状態: $r=0.789$, 体温下降: $r=0.853$)が認められた。

合成カンナビノイドの投与によって、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、CB₁ 受容体拮抗薬で抑制されることから、CB₁ 受容体を介して発現することを確認した。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。

[研究-2: カンナビノイド受容体機能の解析]

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

流通している脱法ハーブ製品より検出されている合成カンナビノイドに着目し、CB₁ 受容体発現細胞を利用して、合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用を解析した。チャイニーズハムスター卵巣細胞: Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にヒト CB₁ 受容体およびヒト G_{α16} をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を確立した。こ

の細胞を使用して、細胞内 Ca^{2+} を測定した。96 穴ブラックプレート (BD Falcon, NJ, USA) に 3.5×10^4 cells/well となるように播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、薬物添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。合成カンナビノイドの代表的な 3 種類の構造化合物、Classical cannabinoids 誘導体 (Hu-210)、Non-classical cannabinoids 誘導体 (CP-55,940, CP-47,497-C8) および Naphthoylindoles 誘導体 (JWH-018, JWH-122, JWH-073) の添加により、細胞内 Ca^{2+} が増加した。この効果は CB_1 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。流通している脱法ハーブに含まれる合成カンナビノイドは、主に CB_1 受容体作用薬であることを確認した。CHO-h CB_1 -h $\text{G}_{\alpha 16}$ 細胞を利用した解析法は、合成カンナビノイドの CB_1 受容体作用性を迅速に検出できる事が明らかになった。

CHO-h CB_1 -h $\text{G}_{\alpha 16}$ 細胞を利用した評価は、合成カンナビノイドの構造に関わり無く、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB_1 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用である。

[研究-3: 培養細胞を利用した合成カンナビノイドの検出]

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

流通している脱法ハーブ製品を検査対象として、 CB_1 受容体発現細胞を利用して、製品中の合成カンナビノイドの混在について検査を実施した。チャイニーズハムスター卵巣細胞: Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にヒト CB_1 受容体およびヒト $\text{G}_{\alpha 16}$ をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-h CB_1 -h $\text{G}_{\alpha 16}$ 細胞を確立した。この細胞を使用して、細胞内 Ca^{2+} を測定した。96 穴ブラックプレート (BD Falcon, NJ, USA) に 3.5×10^4 cells/well とな

るように播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5.0\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、薬物添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。17 種類の脱法ハーブ製品を秤量し、3 倍容量の DMSO にて成分を抽出した。抽出成分を CHO-h CB_1 -h $\text{G}_{\alpha 16}$ 細胞に添加したところ、細胞内 Ca^{2+} が増加し、 CB_1 受容体作用薬の混在が確認された。

CHO-h CB_1 -h $\text{G}_{\alpha 16}$ 細胞を利用した評価は、脱法ハーブ製品中の合成カンナビノイド、特に、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB_1 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用であることが確認された。

C. 考察

1. 合成カンナビノイドの行動薬理学的特性

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の行動薬理学的特性に関する解析を行った。合成カンナビノイドの投与によって、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、 CB_1 受容体拮抗薬で抑制されることから、 CB_1 受容体を介して発現することを確認した。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」といった行動薬理学的マーカーは、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。

2. カンナビノイド受容体機能の解析

合成カンナビノイドは脳内カンナビノイド CB_1 受容体を介して様々な中枢作用を引き起こす事が判明している。合成カンナビノイド

の乱用危険性を推測する上で、CB₁ 受容体に対する作用を解析することは重要である。そこで、カンナビノイド CB₁ 受容体発現細胞を利用して、合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用性を検出するための評価システム確立を試みた。

G タンパク質共役型受容体(GPCR)活性化による即時型のシグナル伝達検出において、Ca²⁺指示薬を利用した細胞内 Ca²⁺変動の検出は極めて有用である。特に、G_{q/11} 共役型受容体については、ホスホリパーゼ C (PLC)を介する細胞内 Ca²⁺上昇について詳細なメカニズムの研究が進んでいる。一方、CB₁ 受容体は主に G タンパク質 Gi および Go との共役が報告されており、アデニル酸シクラーゼを抑制的に制御していると考えられている。こうした非 G_{q/11} 共役型の受容体ファミリーに G タンパク質 G_{α16} を共役させる事により、細胞内 Ca²⁺変動の検出が可能になることが報告されている。そこで、細胞内 Ca²⁺変動の検出感度を上げるため、G タンパク質 G_{α16} をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を確立した。

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した解析から、流通している脱法ハーブ製品より検出されている合成カンナビノイドは CB₁ 受容体作用性を有することが明らかになった。

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した評価は、合成カンナビノイドの構造に関わり無く、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用である。

3. 培養細胞を利用した合成カンナビノイドの検出

流通している脱法ハーブ製品を検査対象として、CB₁ 受容体発現細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用して、合成カンナビノイドの混在について検査を実施した。17 種類の脱法ハーブ製品について検討したところ、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞の細胞内 Ca²⁺が増加し、CB₁ 受容体作用薬の混在が確認された。

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した評価は、脱法ハーブ製品中の合成カンナビノイド、特に、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用であることが確認された。

D. 結論

合成カンナビノイドの行動薬理学的特性に関する解析から、「無動状態」および「体温下降」といった行動薬理学的マーカーは、脱法ハーブに含まれる合成カンナビノイド同定のための一次スクリーニングとして有用である。また、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した評価は、脱法ハーブ製品中の合成カンナビノイド、特に、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用であることが確認された。

本研究の CB₁ 受容体に対する作用強度を解析する評価システムは、違法ドラッグの薬物依存性および細胞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、違法ドラッグの中枢作用および細胞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中枢作用および細胞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細胞毒性を予測することが可能になると考えられる。

E. 健康危険情報

本研究は、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の中枢作用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) 富山健一, 船田正彦:カンナビノイド誘導体の弁別刺激特性と細胞毒性. 日本アルコール・薬物医学会雑誌. (2012) 47 : 135-143.

2. 学会発表

- 1) 船田正彦 : 脱法ドラッグの有害作用 : 脱法ハーブの依存性と毒性の評価研究を中心に. 第 108 回日本精神神経学会学術総会. 札幌. 2012.5.24.
- 2) Funada M, Tomiyama K, Aoo N, Wada K : Discriminative properties and cytotoxicities of cannabinoid receptor agonist CP 55,490. 73th Annual Meeting - College on Problems of Drug Dependence -, Hollywood, Florida, June 23, 2011.
- 3) Funada M, Tomiyama K, Wada K : Activation of the brain noradrenergic system during cannabinoid withdrawal in mice. - College on Problems of Drug Dependence -, Palm Springs, CA, June 11, 2012.

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

研究報告書

合成カンナビノイドの行動薬理学的特性

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）

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】

脱法ハーブの流通拡大は深刻である。脱法ハーブに含まれる化学物質としては、合成カンナビノイドが主流である。この合成カンナビノイドは 100 種類以上の存在が知られており、特定の化学物質が規制されるとその類似構造を有する別の化学物質が登場する悪循環が続いている。本研究では、合成カンナビノイドの行動薬理作用発現におけるカンナビノイド CB₁ 受容体の役割について検討した。

本研究では 10 種類の合成カンナビノイドについて、行動薬理学的特性を解析した。

1. (-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl)cyclohexanol (CP-55,940)
2. 5-(1,1-dimethylheptyl)-2-(3-hydroxycyclohexyl) phenol (CP-47,497)
3. (1-pentyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenyl-methanone (JWH018)
4. (1-butyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenyl-methanone (JWH-073)
5. (4-methyl-1-naphthalenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-122)
6. 2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-ethanone (JWH-203)
7. (4-ethyl-1-naphthalenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-210)
8. [2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenyl-methanone, methanesulfonate ((±)-WIN 55,212)
9. [1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-1-naphthalenyl-methanone (AM-2201)
10. [1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl](4-methyl-1-naphthalenyl)-methanone (MAM-2201)

行動薬理学的解析：10 種類の合成カンナビノイドによる運動活性および体温に対する影響を検討した。すべての合成カンナビノイドにより、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これらの効果は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、CB₁ 受容体が関与することが明らかになった。合成カンナビノイドの無動状態および体温下降の発現と、CB₁ 受容体に対する親和性強度に関する相関性を検討したところ、正の相関(無動状態: $r=0.789$, 体温下降: $r=0.853$)が認められた。「無動状態」および「体温下降」は、CB₁ 受容体作用性を有する合成カンナビノイド同定のための行動薬理学的マーカーとして有用である。

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。

2012年に入り、急激な「脱法ハーブ」の流通拡大が最大の問題となっている。脱法ハーブには、大麻と類似の効果を有する合成カンナビノイドが含まれている。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-hydroxycyclohexyl)-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、類似の中枢作用が発現すると考えられている^{5,6)}。未規制の合成カンナビノイドは多数存在していることから、行動薬理学的手法を用いた危険性を推測するスクリーニング法の確立が必要である。

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 10 種類 (CP-55,940、CP-47,497、CP-47,497-C8、JWH018、JWH-073、JWH-122、JWH-203、JWH-210、AM-2201、MAM-2201, Fig. 1, Fig. 2) による運動活性および体温に対する影響を検討し、合成カンナビノイド同定のための行動薬理学的マーカーとしての有用性を検証した。

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、CP-55,940、CP-47,497、CP-47,497-C8、JWH018、JWH-073、JWH-122、JWH-203、JWH-210、AM-2201、MAM-2201 は Cayman Chem.より購入、CP-47,497-C8 (国立医薬品食品研究所より譲渡)、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。

合成カンナビノイドの特性

合成カンナビノイドにより誘発される無動状態は、バーテスト(高さ 4cm)により測定した。

無動時間のカットオフ時間は30秒とした。

直腸体温は、デジタル温度計(SANWA, TH3型)を用いて測定した。測定用のプローブは3.5cmに設定した。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。

カンナビノイドCB₁受容体拮抗薬AM251は合成カンナビノイド投与15分前に前処置した。

C. 研究結果

合成カンナビノイドの特性

すべての合成カンナビノイドにより、カタレプシー様の無動状態が引き起こされた。同様に、体温下降作用の発現が確認された。これらの効果は、CB₁受容体拮抗薬AM251前処置によって抑制された。無動状態および体温下降の発現には、CB₁受容体が関与することが明らかになった(Fig. 3)。合成カンナビノイドの無動状態および体温下降の発現と、CB₁受容体に対する親和性強度の相関性を検討したところ、正の相関(無動状態: $r=0.789$, 体温下降: $r=0.853$)が認められた。一方、CB₂受容体に対する親和性強度の相関性を検討したところ、有意な相関は認められなかった(Fig. 4)。

D. 考察

合成カンナビノイドの投与によって、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、CB₁受容体拮抗薬で抑制されることから、CB₁受容体を介して発現することを確認した。

大麻の精神活性成分である Δ^9 -THCおよび合成カンナビノイドの作用点は、CB₁受容体およびCB₂受容体であることが明らかになっている^{7,8)}。CB₁受容体は主に中枢神経系に分布しており、CB₂受容体は主に免疫担当細胞に存在していることが確認されている⁵⁾。カンナビノイド受容体の特性については、CB₁受容体およびCB₂受容体ともに7回膜貫通Gi/oタンパク質共役型の構造をしており、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制的に制御し

ていることが明らかになっている。また、CB₁受容体はK⁺チャンネルを活性化し、Ca²⁺チャンネルを抑制することでシナプス伝達を抑制的に制御していることも報告されている^{5,7)}。合成カンナビノイド受容体作用薬である[³H]CP-55,940によるオートラジオグラフィの解析により、カンナビノイド受容体の分布が明らかにされている。CB₁受容体は主に、大脳皮質、海馬、線条体、中脳領域、小脳などに分布しており、運動、記憶および認知機能の調節に関わると考えられている⁵⁾。CB₂受容体は脾臓、扁桃腺リンパ腺、さらに単球、好酸球等の白血球系細胞に多く発現していることから、免疫系の調節や炎症反応に関連している可能性が示唆されている⁵⁾。

大麻の精神活性成分である Δ^9 -THCは、側坐核におけるドーパミン遊離を増加させる作用を有することから、覚せい剤やコカインなどの依存性薬物と同様に、中脳辺縁ドーパミン神経系を制御することにより精神依存を形成すると考えられる⁹⁾。その神経解剖学的な制御機構は、腹側被蓋野においては、抑制性の神経伝達に関与するGABA神経終末に存在するCB₁受容体がGABA遊離を抑制する「脱抑制」機構により、ドーパミン神経系を活性化すると考えられている^{9,10)}。同様に、側坐核から腹側被蓋野へGABA神経が投射しており、中脳辺縁ドーパミン神経を抑制的に制御している。側坐核においては、前頭前皮質から入射するグルタミン酸神経終末にCB₁受容体が存在しており^{5,11)}、グルタミン酸遊離は抑制される。この作用により腹側被蓋野へ投射するGABA神経が抑制され、中脳辺縁ドーパミン神経は活性化されることが示唆されている¹⁰⁾。大麻摂取により Δ^9 -THCが脳内へ移行し、腹側被蓋野と側坐核に存在するCB₁受容体を調節することにより、中脳辺縁ドーパミン神経が制御されている。最近のヒトにおけるPETによる画像解析からも、 Δ^9 -THCが線条体におけるドーパミン神経伝達を増加させることが証明されている¹²⁾。このように、大麻乱用による精神依存形成におい

でも、中脳辺縁ドーパミン神経が重要な役割を果たしていると考えられている。したがって、薬物依存形成においては、CB₁受容体作用が重要であると考えられている。

本研究において、合成カンナビノイドの無動状態および体温下降の発現とCB₁受容体に対する親和性強度に関する相関性を検討したところ、正の相関(無動状態: $r=0.789$, 体温下降: $r=0.853$)が認められた。「無動状態」および「体温下降」は、CB₁受容体作用性を有する合成カンナビノイド同定のための行動薬理的マーカーとして有用である。

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。

E. 結論

本研究において、合成カンナビノイドの無動状態および体温下降の発現とカンナビノイドCB₁受容体に対する親和性強度に関する相関性を検討したところ、正の相関が認められた。「無動状態」および「体温下降」は、CB₁受容体作用性を有する合成カンナビノイド同定のための行動薬理的マーカーとして有用である。

こうした行動薬理的指標による評価システムは、国内で流通している脱法ハーブ含有合成カンナビノイド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。

F. 参考文献

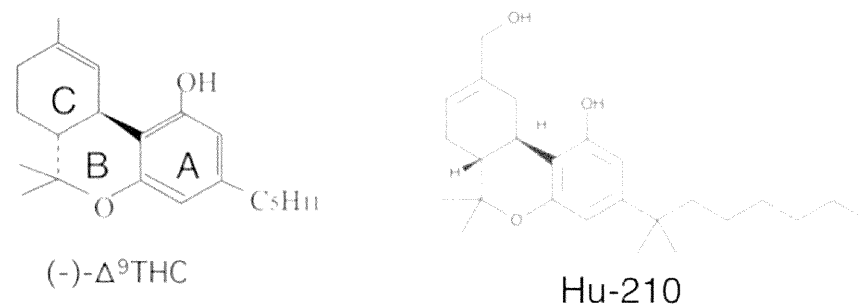
1) Drug Enforcement Administration, Department of Justice. Schedules of

controlled substances: temporary placement of alpha-methyltryptamine and 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine into Schedule I. Final rule. Fed Regist. 68: 1627-1630, 2003.

- 2) De Boer D., Bosman I.: A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. Pharmacy World and Science. 26: 110-113, 2004.
- 3) Rösner P, Quednow B, Girreser U, Junge T.: Isomeric fluoro-methoxy-phenylalkylamines: a new series of controlled-substance analogues (designer drugs). Forensic Sci Int. 148: 143-156, 2005.
- 4) Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Luebbecke M., Wiggermann M., Ernst L. and Beuerle T.: Spice: a never ending story? Forensic Sci Int. 191: 58-63, 2009.
- 5) Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G.: International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev. 54:161-202, 2002.
- 6) 船田正彦: 合成カンナビノイド誘導体の薬物依存性並びに神経毒性の評価. 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)研究報告書(主任研究者: 船田正彦).
- 7) Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. and Bonner, T.I.: Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346: 561-564, 1990.
- 8) Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, S.M.: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature 365: 61-65, 1993.

- 9) Chen JP, Paredes W, Lowinson JH, et al. Strain-specific facilitation of dopamine efflux by delta 9-tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* 1991; 129: 136-180.
- 10) Lupica CR, Riegel AC, Hoffman AF. Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 227-234.
- 11) Svízenská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 2008; 90: 501-511.
- 12) Bossong MG, van Berckel BN, Boellaard R, et al. Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacology* 2004; 34, 759-766.

A) Classical cannabinoid誘導體



B) Nonclassical cannabinoid誘導體

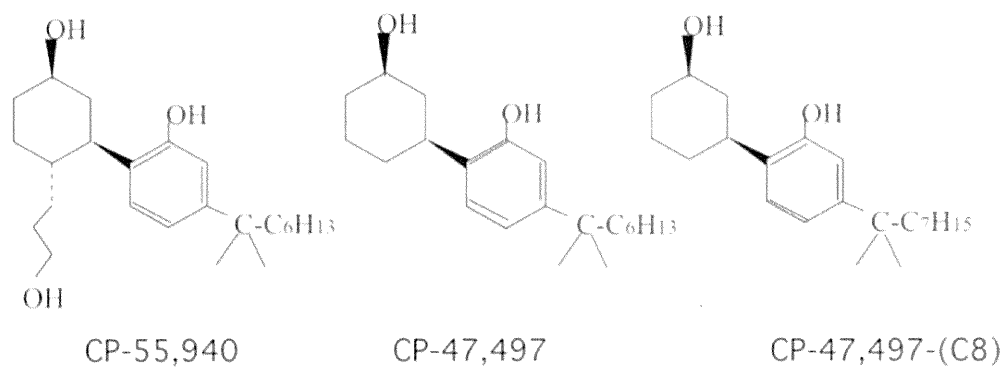


Fig. 1. Chemical structures of Δ^9 -THC, Hu-210, CP-55,940, CP-47,497 and CP-47,497-(C8).

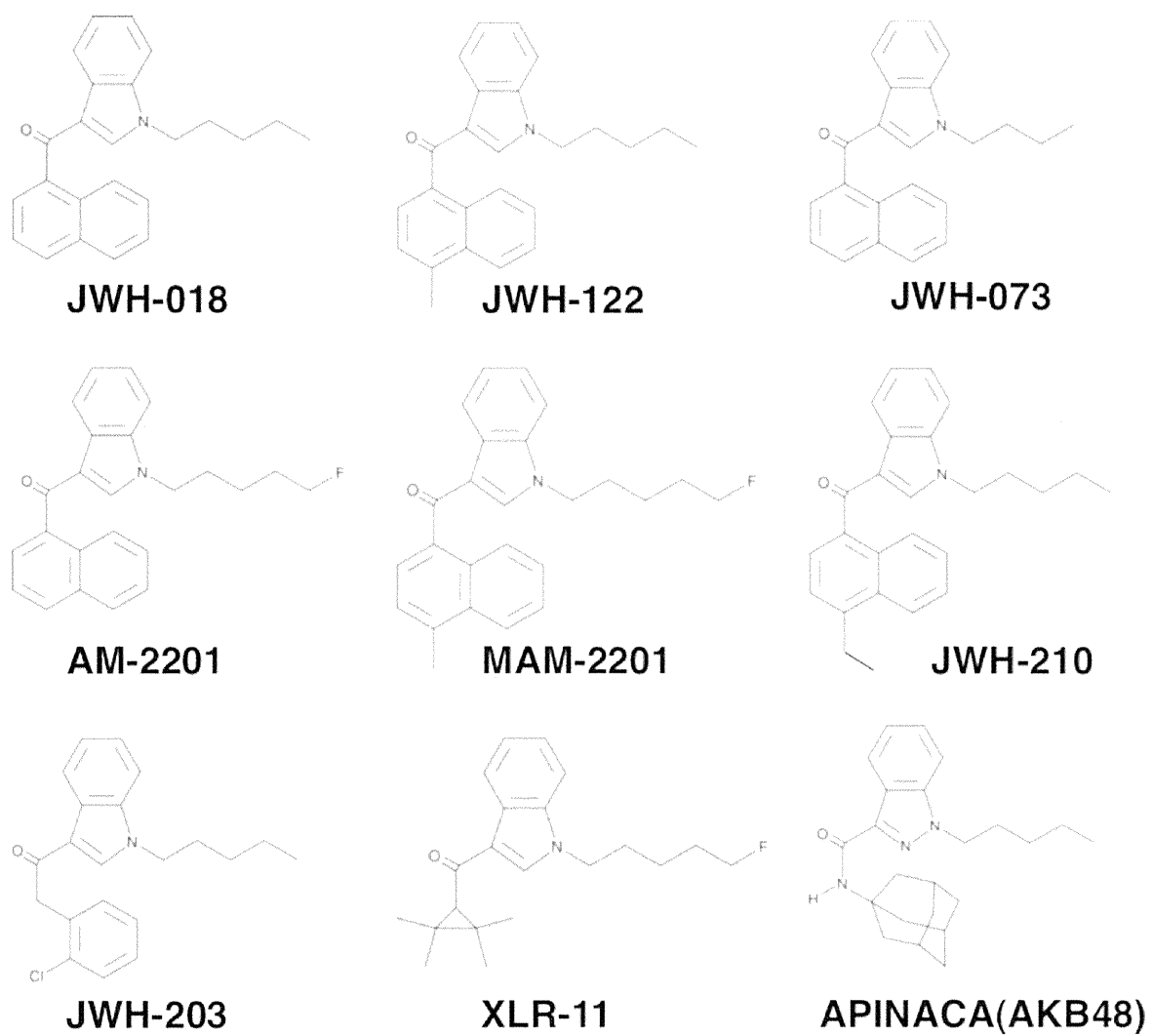


Fig. 2. Chemical structures of cannabimimetic alkylindoles.

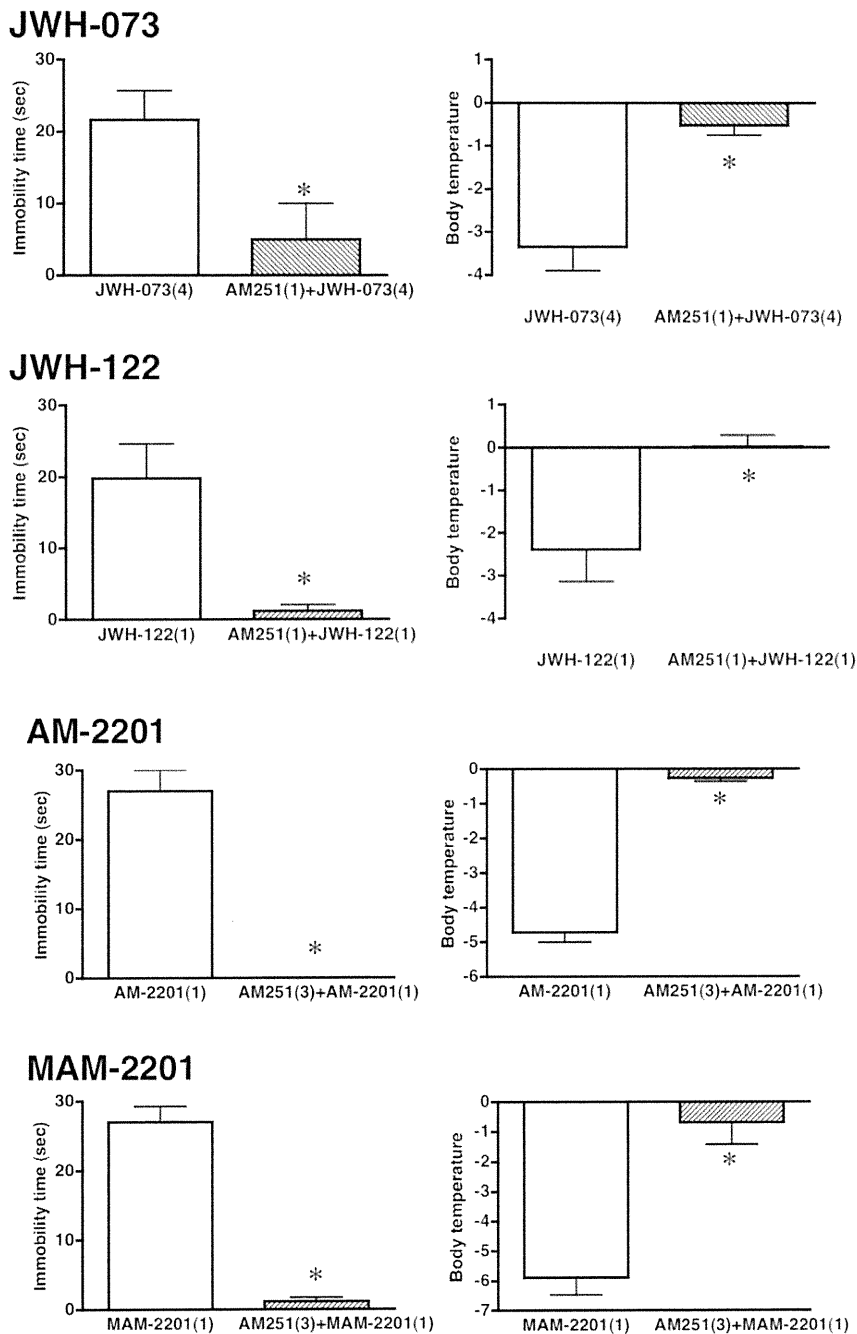
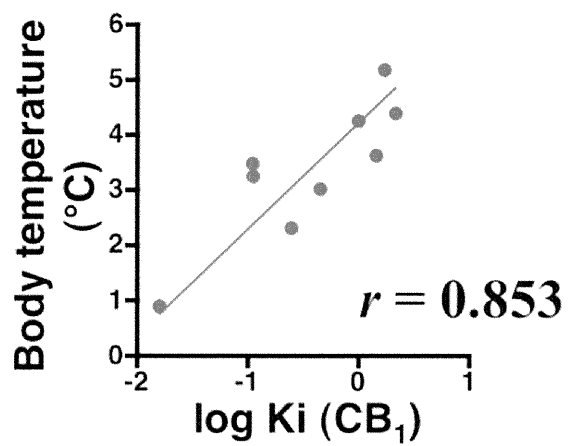
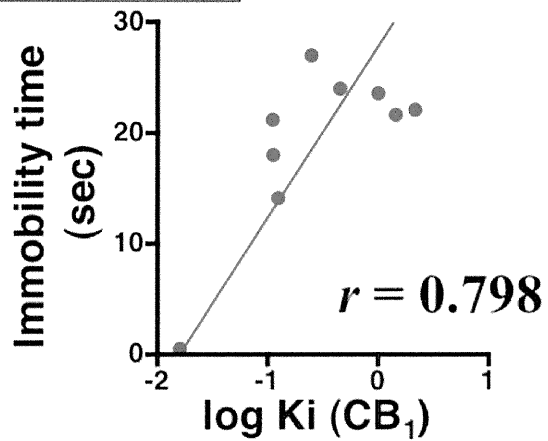


Fig. 3. Effect of cannabinoid receptor antagonist AM251 on synthetic cannabinoid-induced immobility and hypothermia in mice. Changes of motor activity and rectal temperature were measured at 30 min after synthetic cannabinoid treatment. For antagonist study, cannabinoid receptor antagonist AM251 was injected 15 min prior to the synthetic cannabinoids. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 10 animals at 30 min after synthetic cannabinoid treatment.

* $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group.

CB₁受容体



CB₂受容体

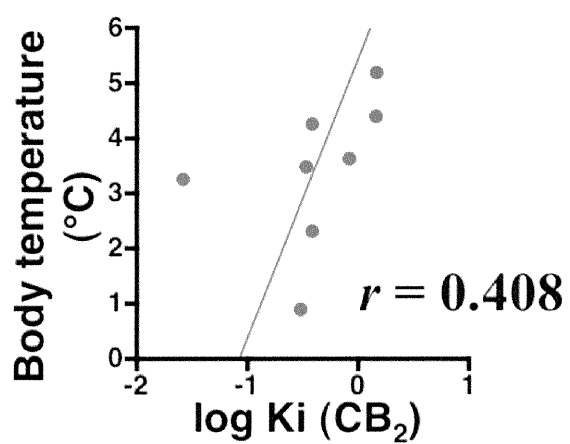
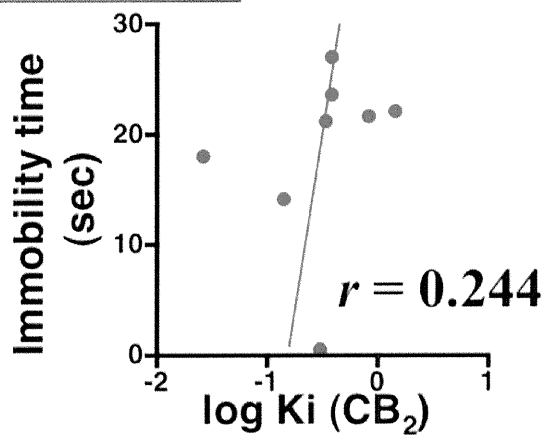


Fig. 4. Scatterplots and regression lines for the relationship between CB₁ and CB₂ binding affinities ($\log K_i$) plotted against effect for each of the two *in vivo* tests (immobility time and body temperature: hypothermia).

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金
培養細胞系を用いた未規制合成カンナビノイドの乱用危険性推測に関する研究
(特別研究事業：H24-特別-指定-012)

研究報告書

カンナビノイド受容体機能の解析

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）

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】

脱法ハーブの流通拡大は深刻である。脱法ハーブに含まれる化学物質としては、合成カンナビノイドが主流である。この合成カンナビノイドは 100 種類以上の存在が知られており、特定の化学物質が規制されるとその類似構造を有する別の化学物質が登場する悪循環が続いている。

流通している脱法ハーブ製品より検出されている合成カンナビノイドに着目し、CB₁ 受容体発現細胞を利用して、合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用を解析した。チャイニーズハムスター卵巣細胞：Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にヒト CB₁ 受容体およびヒト G_{α16} をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を確立した。この細胞を使用して、細胞内 Ca²⁺ を測定した。CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞に蛍光指示薬 Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、薬物添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。合成カンナビノイドの代表的な 3 種類の構造化合物、Classical cannabinoids 誘導体 (Hu-210)、Non-classical cannabinoids 誘導体 (CP-55,940, CP-47,497-C8) および Naphthoylindoles 誘導体 (JWH-018, JWH-122, JWH-073) の添加により、細胞内 Ca²⁺ が増加した。この効果は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。流通している脱法ハーブに含まれる合成カンナビノイドは、主に CB₁ 受容体作用薬であることを確認した。CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した解析により、合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用性を迅速に検出できることが明らかになった。

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を利用した評価は、合成カンナビノイドの構造に関わり無く、強力な精神作用を発現する危険性の高い CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ高感度の検出法として有用である。

A. 研究目的

脱法ハーブは、カラフルなイラストやロゴが貼付された製品として流通しており、インターネットや店舗ではお香やハーブと偽装して販売されている。その中身は、細かく刻まれた乾燥植物片が入っているが、この乾燥植物片には合成された化学物質（薬物）が混在している。この化学物質入りの植物片を巻きたばこやパイプにより吸煙すると、興奮作用や幻覚等の精神作用が発現する。乾燥した植

物片自体には、精神作用を示す成分が含まれておらず、混在している化学物質が強力な精神作用を引き起こすのである。

脱法ハーブは植物片を悪用しているため、あたかも天然物であるという印象を受け易い。しかしながら、脱法ハーブの乱用は「薬物自体」を乱用していることに他ならないことを認識する必要がある。

脱法ハーブの代表的な製品としては「Spice、K2」等が知られており、2004 年以降欧米各国でインターネットを通じて広く流通した。吸

煙すると、「大麻のような効果が味わえる」製品として、「合法ハーブ」や「模造大麻」などと呼ばれ、薬物乱用者の間で注目を集めるようになった。2006年頃になると欧米各国では脱法ハーブの店舗販売が始まり、その流通の拡大に拍車がかかった。2006年以降、我が国でも流通が確認され、2009年には世界各国で乱用されるようになり、その流通は世界的な薬物乱用問題となった¹⁾。特に、我が国では2011年10月以降急激な脱法ハーブ販売店舗数の増加により、その乱用が深刻化した。

脱法ハーブは、「規制されている成分や薬物を含まない製品」として流通した。当初は、大麻と類似の作用を示すため、乾燥した大麻草が含まれている可能性が指摘されていた。しかしながら、製品から大麻の精神活性成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)および大麻草自体が検出される例はごく僅かであった。やがて、各国にて脱法ハーブの吸煙によって、意識障害や呼吸困難を引き起こすことが報告され、乱用によって重篤な健康被害を引き起こすことが明らかになった。そこで、脱法ハーブに混在する化学物質の解析が実施され、その当時まで目立った乱用は確認されていなかった化学物質が含まれている事が明らかになった¹⁾。それは大麻と類似の作用を発現させる「合成カンナビノイド」と呼ばれる薬物であった¹⁻³⁾。

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としては5-(1,1-dimethylheptyl)-2-(3-hydroxycyclohexyl) 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-hydroxycyclohexyl)-phenol (CP-47,497-C8)、1-pentyl-3-(1-naphthoyl)indole (JWH-018)などが検出されている¹⁾。さらに、複数の合成カンナビノイド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。未規制の合成カンナビノイドは多数存在していることから、簡易検出方法を用いた危険性を推測するスクリー

ニング法の確立が必要である。

流通が確認されている合成カンナビノイドは、大麻の主要な精神活性成分である 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、類似の中枢作用が発現すると考えられている。特に、脳内CB₁受容体は、中枢作用および薬物依存形成において重要であることが報告されている^{4,5)}。簡易検出方法を用いた危険性を推測するスクリーニング法の確立のために、CB₁受容体に対する作用を指標にした解析が重要であると考えられる。

CB₁受容体は、Gタンパク質Gi共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼを抑制的に制御していることが明らかになっている^{6,7)}。機能評価としては、細胞内cAMP定量により、その機能を解析する手法がとられる。こうしたGiタンパク質共役受容体によって誘導される効果の検出は、アデニル酸シクラーゼを刺激(最大60%程度)し、cAMPを増加させ、Gi共役受容体に対する作用薬によるcAMP量の減少を指標に機能が解析されている⁸⁾。しかしながら、こうした評価系は放射標識物質の使用等の検出過程は、煩雑である。そこで、より簡便な評価系の構築が必要になる。Gタンパク質G_q共役型受容体の活性化は、ホスホリパーゼC β (PLC β)によるイノシトール1,4,5-三リン酸(IP₃)の産生を介する細胞内Ca²⁺の放出を引き起こす。受容体機能解析の手法として、この細胞内Ca²⁺増加作用は即時的な作用であり、検出方法として有用である。

遺伝子導入技術を使用した細胞工学の研究から、キメラ(G_{q15})またはプロミスカス(promiscuous)なGタンパク質(G _{$\alpha_{15/16}$})を利用することによって、Gi共役型受容体の正常な薬理的エフェクターをアデニル酸シクラーゼからPLC β 経路に変換することが可能である⁹⁾。

本研究では、チャイニーズハムスター卵巣細胞：Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にヒトCB₁受容体およびヒトG _{α_{16}} をトランスフェクションし、CB₁受容体およびG _{α_{16}} 発現安