

定細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を確立した (Fig. 1)。この細胞を使用して、合成カンナビノイドによる細胞内 Ca²⁺ に対する影響を検討した。

B. 研究方法

細胞樹立: 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。CB₁ 受容体の発現は、免疫染色により確認した。CHO 細胞に 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を加え 4°C で 15 分間固定化を行った。次に、100%メタノールを加えて、-20°C で 20 分間透過処理を行ったあと PBS で洗浄した。1% BSA 入り PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体として goat polyclonal anti-CB₁ (N-15, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を用いて 4°C でオーバーナイトの抗体反応を行った。PBS-Tween で洗浄し、2 次抗体として Alexa Fluor 488 rabbit anti-goat IgG (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて室温で 1 時間抗体反応を行った。

カンナビノイド CB 受容体作用の解析

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を使用し、継代 24 時間後に評価に用いた。96 穴ブラックプレート (BD Falcon, NJ, USA) に 3.5×10⁴ cells/well となるように播種し、37°C・5.0%CO₂ 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細胞毒性

CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を使用し、継代 24 時間後に評価に用いた。96 穴ブラックプレート (BD Falcon, NJ, USA) に 3.5×10⁴ cells/well となるように播種し、37°C・5.0%CO₂ 条件下で培養した。24 時間後、薬物を添加し、2 時間後の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。対照群は溶媒であ

る 0.1% (DMSO+ Tocrisolve 100) を処置した。細胞毒性の評価は CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay kit (Promega Corporation, Madison, WI) 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: 花尻瑠理先生、合田幸広先生より譲渡)、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。

C. 研究結果

カンナビノイド CB 受容体作用の解析

本研究では、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。細胞において、CB₁ 受容体の発現を確認した (Fig. 2)。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。CP-55,940 の添加により、濃度依存的に蛍光強度が増大した。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 (Fig. 3)。同様に、Classical cannabinoids 誘導体 (Hu-210)、Non-classical cannabinoids 誘導体 (CP-47,497-C8) および Naphthoylindoles 誘導体 (JWH-018, JWH-122, JWH-073) の添加により、濃度依存的に蛍光強度が増大した (Fig. 4, Fig. 5)。これらの効果は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された (Fig. 6)。一方、選択的カン

ナビノイド CB₂ 受容体作用薬である CB65 の添加では蛍光強度の増大は認められなかった。

合成カンナビノイドの細胞毒性

合成カンナビノイドである CP-55,940 の添加により、細胞毒性の発現が確認された(Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、合成カンナビノイドの中樞作用の発現に關与する CB₁ 受容体作用性を検出する細胞の構築を試みた。カンナビノイド 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^{6,7)}。アデニル酸シクラーゼの機能に關する評価系は、特殊なキットや放射活性物質を利用するなど高度な技法を要するため、G タンパク質 Gi 共役型受容体である CB₁ 受容体の機能解析のための簡易評価法の構築が必要である。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_{α15/16})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⁾。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。

本研究では、Chinese Hamster Ovary (CHO) 卵巣細胞を利用して、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、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を確立した。免疫染色による解析から、CB₁ 受容体が発現しており、CB₁ 受容体発現安定細胞株 CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞の確立を確認した。この細胞を使用して、細胞内 Ca²⁺を測定したところ、合成カンナビノイドにより蛍光強度が増大し、細胞内 Ca²⁺は増加することが示唆された。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ことから、CB₁ 受容体-G_{α16} 細胞

-PLC β を介して、細胞内 Ca²⁺は増加する可能性が示唆された。

また、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 Naphthoyl-indoles 誘導体 (JWH-018, JWH-122, JWH-073) の作用を検討したところ、すべての薬物により、細胞内 Ca²⁺が増加し、これらの効果は CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。したがって、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞による評価系では、合成カンナビノイドの化学構造に關わり無く、CB₁ 受容体に対する受容体作用性を解析できることが明らかになった。

本研究では、カンナビノイド受容体の発現が確認されている CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を使用して、合成カンナビノイド添加による細胞毒性の発現について検討した。その結果、CP-55,940 の添加により、細胞毒性の発現が確認された。合成カンナビノイドは、細胞毒性を示すことが確認された。合成カンナビノイドの細胞毒性の評価において、カンナビノイド受容体が発現している CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞による検討は、迅速かつ高感度に評価結果が得られ、有用な方法であると考えられる。CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞では、合成カンナビノイドの細胞毒性の評価も可能であったことから、検出のみならず有害作用の評価への応用も期待できる。

合成カンナビノイドは、一部の化学構造が異なる、いわゆる「稀少構造差異を有する化学物質」の流通が主流である。流通している合成カンナビノイドの主要な作用点は CB₁ 受容体であることから、CB₁ 受容体作用薬の迅速かつ簡便な検出方法は、規制速度を上げ、「いたちごっこ」を断つために非常に有用であると考えられる。

以上の結果から、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞は合成カンナビノイドの CB₁ 受容体作用を検出するための tool として応用できることが判明した。

E. 結論

本研究では、合成カンナビノイドの中枢作用の発現に關与するCB₁受容体作用性を検出する細胞の構築を試みた。CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞を確立し、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 tool として応用できることを明らかにした。

CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞による評価システムにより、国内で流通が確認されている脱法ハーブ等違法ドラッグに含まれる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) 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.
- 2) Melvin L.S., Milne G.M., Johnson M.R., Subramaniam B., Wilken G.H. and Howlett A.C.: Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol Pharmacol* 44: 1008-1015, 1993.
- 3) Manera C., Tuccinardi T. and Martinelli A.: Indoles and related compounds as cannabinoid ligands. *Mini Rev Med Chem.* 8: 370-387, 2008.
- 4) 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* 90: 501-511, 2008.
- 5) Cooper ZD, Haney M., Cannabis reinforcement and dependence: role of the cannabinoid CB1 receptor. *Addict Biol.* 13: 188-195, 2008.
- 6) Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL., Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48: 443-450, 1995.
- 7) Turu G, Hunyady L., Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol.* 44: 75-85, 2010.
- 8) Greasley PJ., Jansen RP., G-protein-coupled receptor screening technologies. *Drug Discovery Today Technologies* 2: 163-170, 2005.
- 9) Liu AM, Ho MK, Wong CS, Chan JH, Pau AH, Wong YH., Galpha(16/z) chimeras efficiently link a wide range of G protein-coupled receptors to calcium mobilization. *J Biomol Screen.* 8: 39-49, 2003.

CB₁受容体とGタンパク質G α 16サブユニット

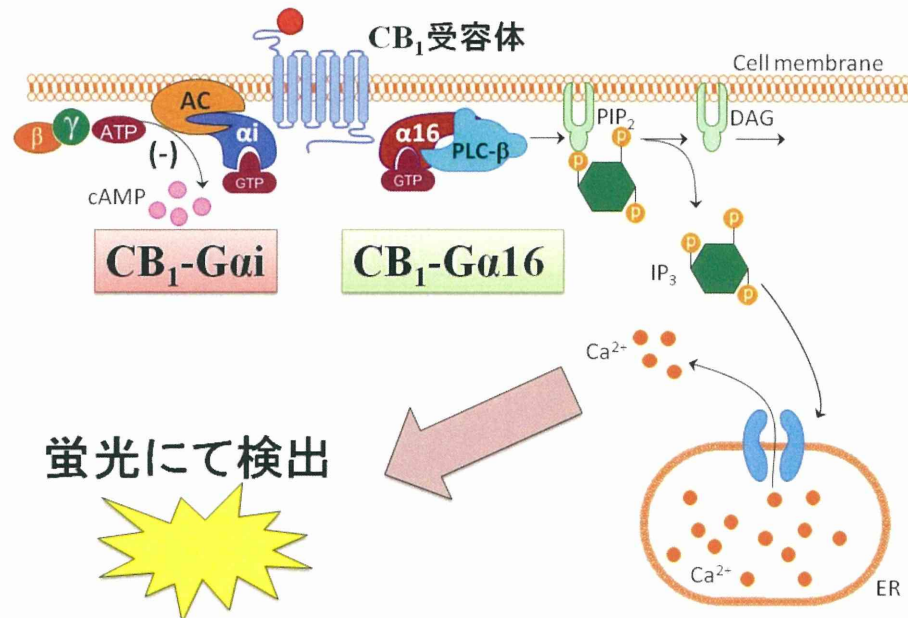


Fig. 1. Typical patterns of cannabinoid CB₁ receptor/G protein coupling signaling pathways. Basic patterns of CB₁ receptor-G protein coupling have been found which critically define the cellular response after ligand-dependent receptor activation. Members of the G_{i/o} G-protein subfamily primarily act to inhibit adenylyl cyclase to reduce the secondary messenger, cAMP. Decreases in cellular cAMP lead to inhibit of protein kinase A (PKA) and the phosphorylation of specific cellular substrates leading to cellular responses. The G_{q/11} subfamily members all act to stimulate phospholipase C β , an enzyme promoting the hydrolysis of membrane-associated phosphatidylinositol species (PI, PIP and PIP₂) to form inositol phosphates (IP, IP₂ and IP₃) and diacylglycerol (DAG), an activator of protein kinase C (PKC). These ultimately lead to increases in levels of intracellular calcium and activation of PKC, as well as other calcium-dependent proteins. The promiscuous nature of G α ₁₆ allows it to interact with numerous G protein-coupled receptors, several G_i-linked receptors are incapable of activating phospholipase C via G α ₁₆. CHO-hCB₁-hG α ₁₆ cells: It is used as a host cell for transfection expression of G_s and G_{i/o}-coupled receptors, the constitutively expressed G α ₁₆ protein in the cells allows many transfected receptors which normally stimulate/inhibit the cAMP pathway, to couple to G_q signal transduction and mobilize intracellular calcium.

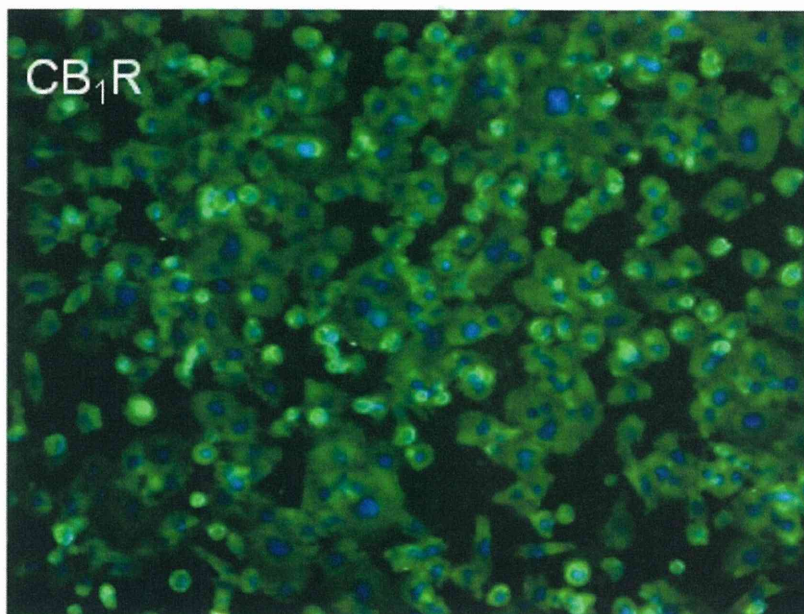


Fig. 2. Expression of cannabinoid CB₁ receptors on CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. Fixed and permeabilized CHO-hCB₁-hG_{α16} cells were incubated with the anti-polyclonal goat anti-CB₁-R antibody (N-15, 1:500). Antibody binding was detected using Alexa Fluor 488-conjugated anti-goat IgG. Cell nuclei were labeled using DAPI. Cell morphology was examined using fluorescence microscopy. (B). Fluorescence images of double immunostaining of the CB₁ receptor (green) and nuclei (blue) in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells are shown.

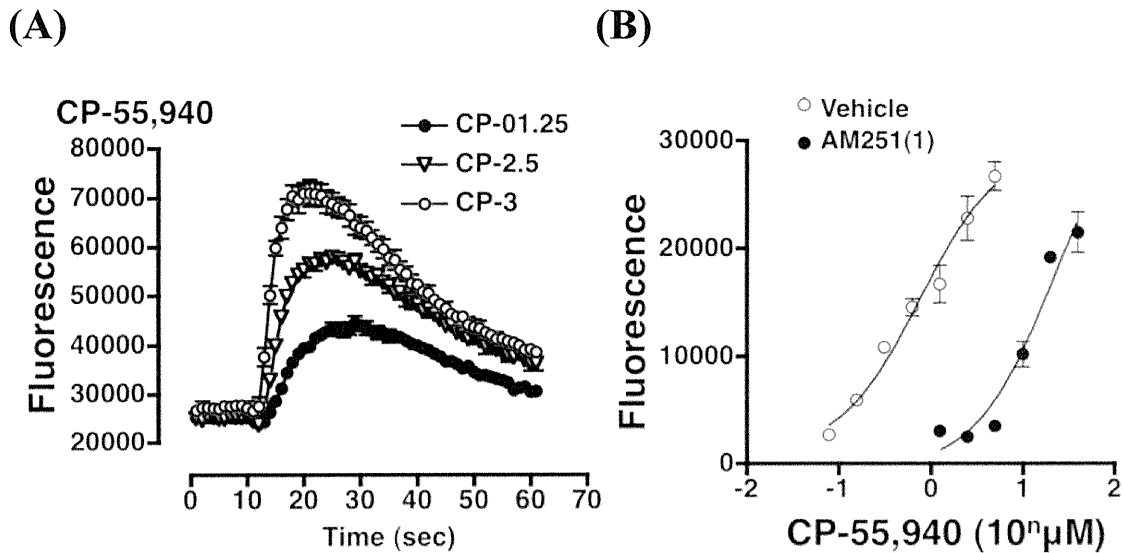


Fig. 3. Effect of the synthetic cannabinoid on the intracellular Ca^{2+} in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. CHO-hCB₁-hG_{α16} cells subsequently labeled with Fluo-4. (A) CP-55,940 induced changes in intracellular Ca^{2+} were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. Data are expressed as the change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 3 such experiments. (B) CHO-hCB₁-hG_{α16} cells responded in a dose-dependent manner to CP-55,940 with robust increases in intracellular Ca^{2+} . Concentration-dependent effect of cannabinoid receptor antagonist AM251 on the concentration response curves for the calcium increase induced by CP-55,940. Maximum change in FIU over baseline was used to determine agonist response. Cannabinoid receptor antagonist AM251 was treated 15 min prior to the synthetic cannabinoid treatment.

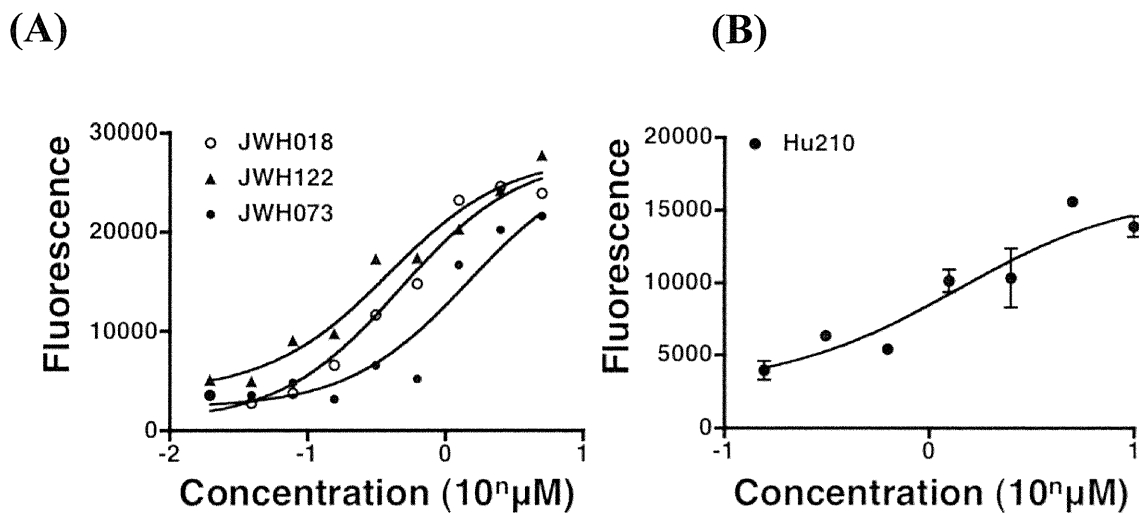


Fig. 4. Effects of synthetic cannabinoids on the intracellular Ca^{2+} in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. CHO-hCB₁-hG_{α16} cells subsequently labeled with Fluo-4. (A) Naphthoylindoles (JWH-018, JWH-122, JWH-073) or (B) classical cannabinoid (Hu-210) induced changes in intracellular Ca^{2+} were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. Data are expressed as the maximum change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 3 such experiments.

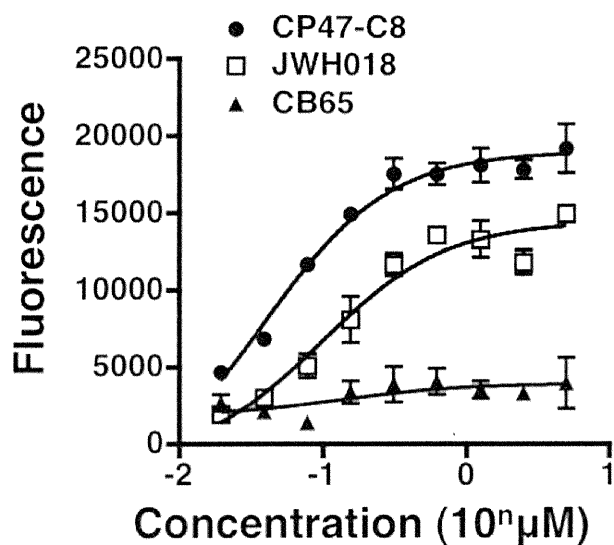


Fig. 5. Effects of “spice-related” synthetic cannabinoids CP-47,497-C8, JWH-018 or CB₂ receptor agonist CB65 on the intracellular Ca²⁺ in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. CHO-hCB₁-hG_{α16} cells subsequently labeled with Fluo-4. Synthetic cannabinoids induced changes in intracellular Ca²⁺ were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. Data are expressed as the maximum change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 3 such experiments.

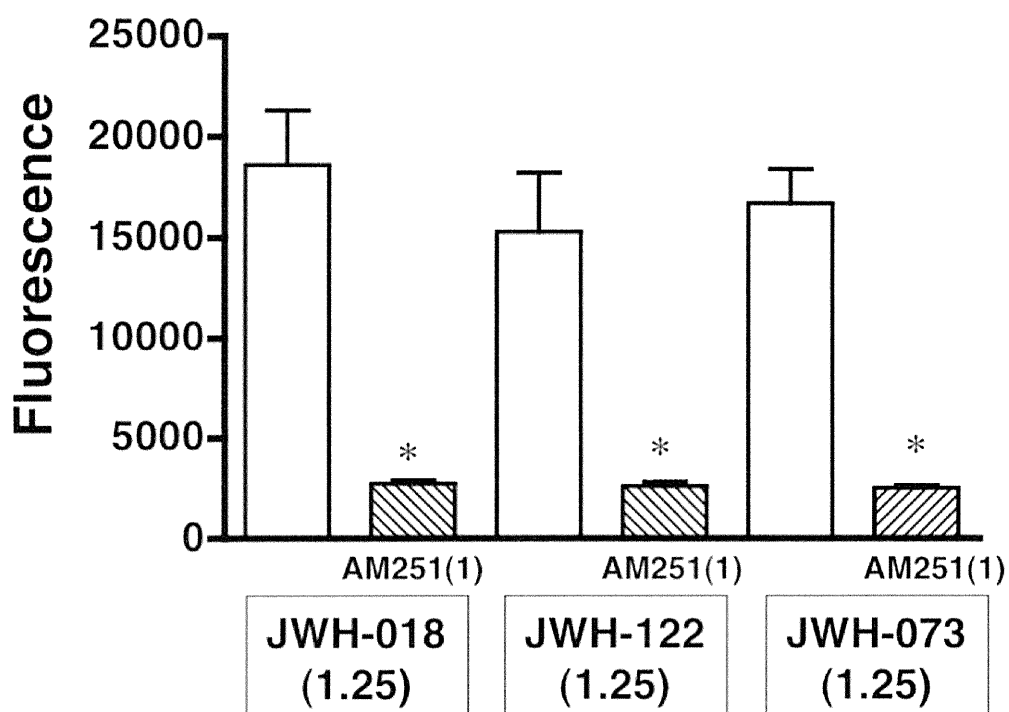


Fig. 6. Effect of pretreatment with CB₁ receptor antagonist AM251 on the calcium increase induced by synthetic cannabinoids in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. Synthetic cannabinoids induced changes in intracellular Ca²⁺ were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. Data are expressed as the change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 3 such experiments. Maximum change in fluorescent over baseline was used to determine agonist response. Cannabinoid receptor antagonist AM251 (1 μM) was treated 15 min prior to the synthetic cannabinoid treatment (1.25 μM).

*P<0.05 vs. JWH compound alone.

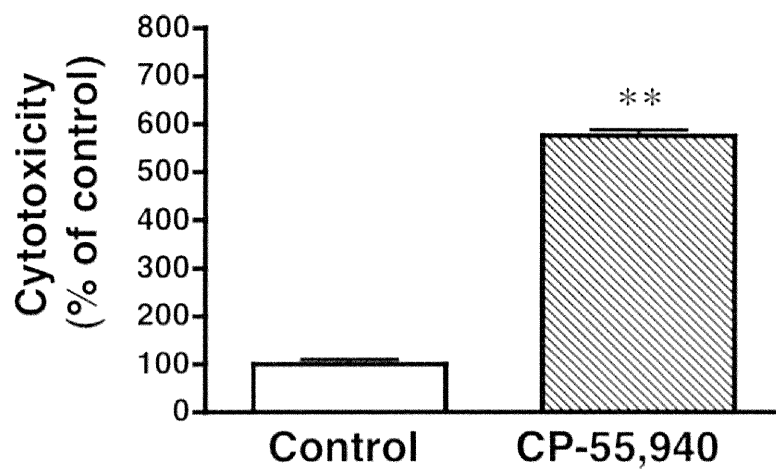


Fig. 7. Synthetic cannabinoid receptor agonist CP-55,940-induced cytotoxicity in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. Cytotoxicity was evaluated following 2 h exposure to CP-55,940 (30 μM). Data are expressed as percent of the 0.1% DMSO control, and are presented as means±SEM from three total wells analyzed across two independent experiments.

**P<0.01 vs. Control group.

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

培養細胞を利用した合成カンナビノイドの検出

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中樞作用発現において、脳内 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ている。化学物質の CB₁ 受容体作用が検出可能である CB₁ 受容体およびヒト G_{α16} 発現安定細胞株、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞を樹立し、脱法ハーブ抽出成分添加による影響を検討した。CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞に蛍光指示薬 Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、脱法ハーブ抽出成分添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。

流通している 17 種類の脱法ハーブ製品を検査対象として、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。すべての脱法ハーブ製品において、CHO-hCB₁-hG_{α16} 細胞の蛍光強度は増大し、CB₁ 受容体作用薬の混在が確認された。

本研究より、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。

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。

脱法ハーブに含まれている成分としては、大麻の精神活性成分である Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)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⁾。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。

合成カンナビノイドの中樞作用発現において、脳内カンナビノイド CB_1 受容体が重要な役割を果たしてい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、カンナビノイド CB_1 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。

カンナビノイド CB_1 受容体は、G タンパク質 G_i 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^{6,7)}。作用評価としては、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、 G_i 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。受容体機能解析の手法として、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 $C\beta$ (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 Ca^{2+} の放出を引き起こす。この細胞内 Ca^{2+} 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、 G_i 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、CHO細胞にヒト CB_1 受容体およびヒト $G_{\alpha 16}$ をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-h CB_1 -h $G_{\alpha 16}$ 細胞を確立した。この細胞を使用して、細胞内 Ca^{2+} の増大を指標に、脱法ハーブ製品中の合成カンナビノイドの混在を検証した。

B. 研究方法

細胞樹立: CHO 卵巣細胞にヒト CB_1 受容体およびヒト $G_{\alpha 16}$ をトランスフェクションし、発現安定細胞株 CHO-h CB_1 -h $G_{\alpha 16}$ 細胞を確立した。

脱法ハーブ製品の解析

CHO-h CB_1 -h $G_{\alpha 16}$ 細胞を使用し、継代24時間後に評価に用いた。96穴ブラックプレート(BD Falcon, NJ, USA)に 3.5×10^4 cells/well とするように播種し、37°C・5.0%CO₂ 条件下で培養した。24時間後、Fluo-4を1時間取り込ませ、脱法ハーブ抽出成分添加による蛍光強度の変化を、Flexstation IIにより測定した。

使用検体: 脱法ハーブ製品 17種類(2011.12.20~2012.11.30において販売された製品)。脱法ハーブ製品は重量を秤量し、DMSO 溶媒中50°Cで60分間成分の抽出を行った。

合成カンナビノイドとしては、1-pentyl-N-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl-1H-indazole-3-carboxamide (APINACA, Cayman Chemical Company, Michigan, USA)、(1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl) (2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl) methanone (XLR-11, Cayman Chemical Company, Michigan, USA)、カンナビノイド CB_1 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)を使用した。

C. 研究結果

脱法ハーブ製品の解析

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、CB₁受容体およびG_{α16}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}細胞に脱法ハーブ抽出成分を添加したところ、17製品全てにおいて蛍光強度が増大した(Fig. 1)。解析した3製品について、合成カンナビノイドが検出された(Fig. 2)。また、3製品について、誘発される蛍光強度の増大は、CB₁受容体拮抗薬AM251の前処置により完全に抑制された(Fig. 3A)。さらに、3製品から抽出された合成カンナビノイドの標準品APINACAおよびXLR-11について(Fig. 2)、CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞を利用して、細胞内Ca²⁺に対する影響を検討した。CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞においてAPINACAおよびXLR-11の添加によって、濃度依存的に蛍光強度が増大した(Fig. 3B)。

D. 考察

本研究では、CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞による合成カンナビノイド検出システムの妥当性について検証した。

脱法ハーブ製品17種類(2011.12.20~2012.11.30において販売された製品)の抽出成分について検討したところ、CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞においてすべての製品で蛍光強度が増大し、CB₁受容体作用性の化学物質の混在が示唆された。脱法ハーブ抽出成分による蛍光強度の増大は、CB₁受容体拮抗薬により完全に抑制されることから、CB₁受容体作用薬であることが判明した。

3製品について、含有成分を分析した結果から、APINACAおよびXLR-11などの合成カンナビノイドが検出されていることから、CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞の蛍光強度を指標にし

た検出システムは非常に有用である事が判明した。

合成カンナビノイドは、一部の化学構造が異なる、いわゆる「稀少構造差異を有する化学物質」の流通が主流である。流通している合成カンナビノイドの主要な作用点はCB₁受容体であることから、CB₁受容体作用薬の迅速かつ簡便な検出方法は、規制速度を上げ、「いたちごっこ」を断つために非常に有用であると考えられる。

以上の結果から、CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞は脱法ハーブ製品に含まれる合成カンナビノイドのCB₁受容体作用を検出するためのtoolとして応用できることが判明した。

E. 結論

本研究では、CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞を確立し、脱法ハーブ製品中のCB₁受容体作用物質を検出するためのtoolとして応用できることを明らかにした。

CHO-hCB₁-hG_{α16}細胞による評価システムにより、国内で流通が確認されている脱法ハーブ等違法ドラッグに含まれる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) 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.
- 2) Melvin L.S., Milne G.M., Johnson M.R., Subramaniam B., Wilken G.H. and Howlett A.C.: Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol Pharmacol* 44: 1008-1015, 1993.
- 3) Manera C., Tuccinardi T. and Martinelli A.:

Indoles and related compounds as cannabinoid ligands. *Mini Rev Med Chem.* 8: 370-387, 2008.

- 4) 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* 90: 501-511, 2008.
- 5) Cooper ZD, Haney M., Cannabis reinforcement and dependence: role of the cannabinoid CB1 receptor. *Addict Biol.* 13: 188-195, 2008.
- 6) Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL., Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48: 443-450, 1995.
- 7) Turu G, Hunyady L., Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol.* 44: 75-85, 2010.
- 8) Greasley PJ., Jansen RP., G-protein-coupled receptor screening technologies. *Drug Discovery Today Technologies* 2: 163-170, 2005.
- 9) Liu AM, Ho MK, Wong CS, Chan JH, Pau AH, Wong YH., Galpha(16/z) chimeras efficiently link a wide range of G protein-coupled receptors to calcium mobilization. *J Biomol Screen.* 8: 39-49, 2003.

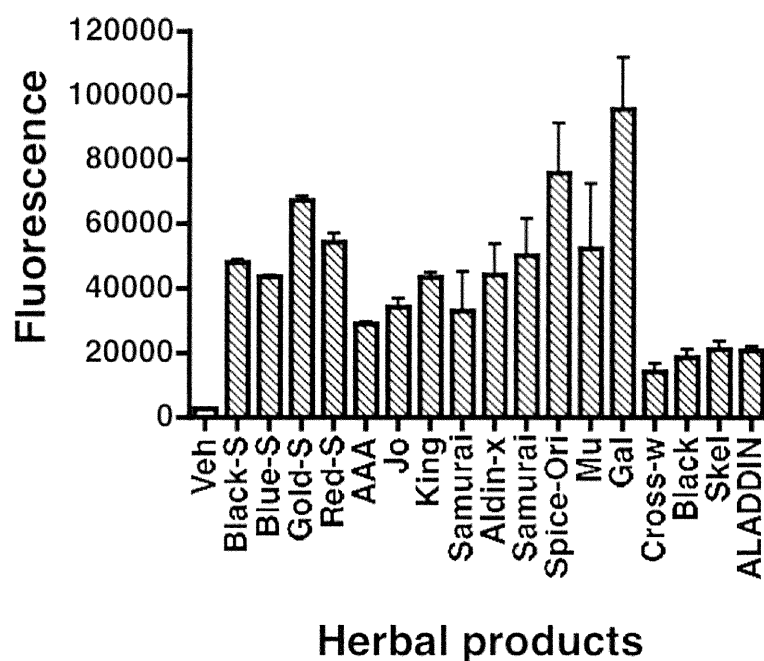


Fig. 1. Effects of “herbal incense” products on the intracellular Ca^{2+} in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. CHO-hCB₁-hG_{α16} cells subsequently labeled with Fluo-4. Seventeen herbal products were analyzed. The plant material was extracted in a DMSO 50°C. A 100-mg portion of the product was crushed into powder and extracted with 300 μl of DMSO under 50°C for 60 min. After centrifugation for 5 min at 3000 rpm, the supernatant solution was passed through a centrifugal filter (Chromatodisk-GL, 0.45 μm filter unit, gene science, Tokyo, Japan). Supernatant solution (1/100 volume) induced changes in intracellular Ca^{2+} were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. Data are expressed as the maximum change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 3 such experiments.



脱法ハーブ製品	検出化合物
BLACK by LIBIDO	XLR-11 XLR-11 N-(4pentenyl) analog APINACA N-(5-fluoropentyl) analog
Skeleton 7 th Generation	APINACA N-(5-fluoropentyl) analog
ALADDIN premium	AB-PINACA AB-FUBINAKA

Fig. 2. Photographes of “herbal incense” products (purchased on Nov. 10, 2012). In the sample solution of the product, five synsthetic cannabinoids were detected by LC-ESI-MS analysis (Dr. Kikura-Hanajiri, NIHS, Japan).

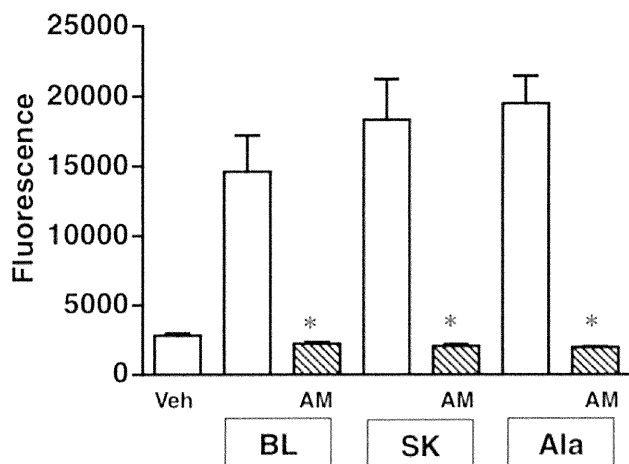
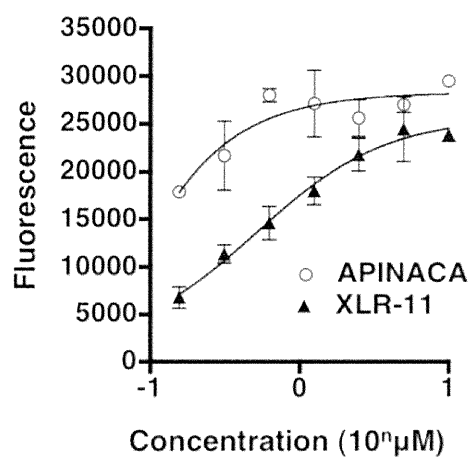
(A)**(B)**

Fig. 3. Effects of “herbal incense” products on the intracellular Ca^{2+} in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. CHO-hCB₁-hG_{α16} cells subsequently labeled with Fluo-4. (A) Three herbal products were analyzed. The plant material was extracted in a DMSO 50°C. A 100-mg portion of the product was crushed into powder and extracted with 300 μl of DMSO under 50°C for 60 min. After centrifugation for 5 min at 3000 rpm, the supernatant solution was passed through a centrifugal filter (Chromatodisc-G/L, 0.45 μm filter unit, gene science, Tokyo, Japan). Supernatant solution (1/100 volume) induced changes in intracellular Ca^{2+} were measured in a Flexstation II over a period of 60 s. (B) Effect of synthetic cannabinoids (APINACA and XLR-11) that detected in herbal products on the intracellular Ca^{2+} in CHO-hCB₁-hG_{α16} cells. Data are expressed as the maximum change in fluorescent intensity units over background and are from a single experiment with triplicate determinations, representative of a total of 3 such experiments. *P<0.05 vs. herbal product group.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	47	135-143	2012

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

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)
平成 25 年 (2013 年) 3 月 31 日発行

