

Fig. 1 4-エチルメトカチノン及び6-APBの構造

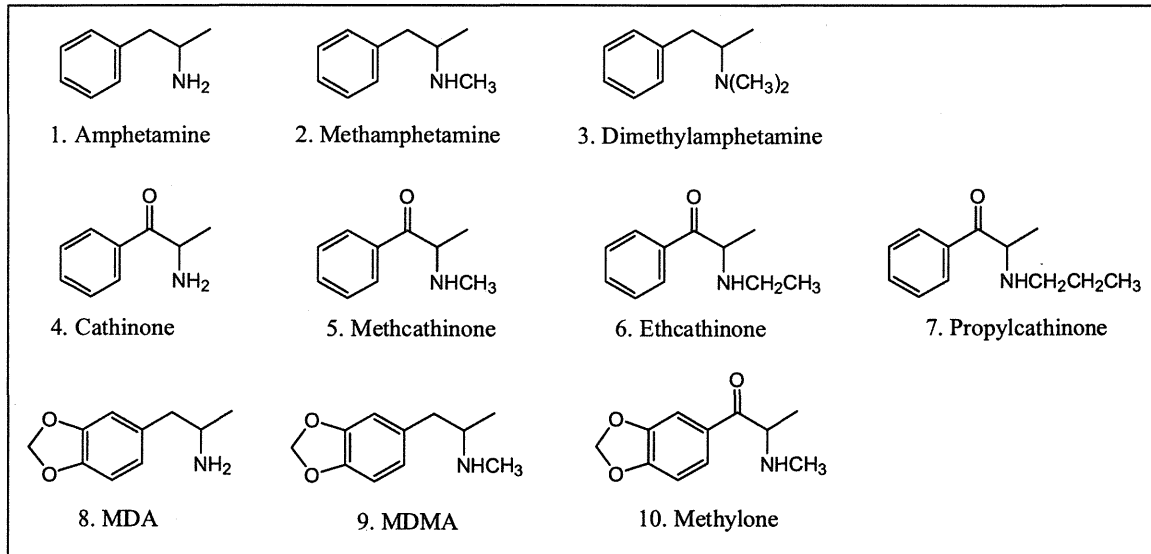


Fig. 2 モデル構築に使用した構造類似化合物の構造

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.

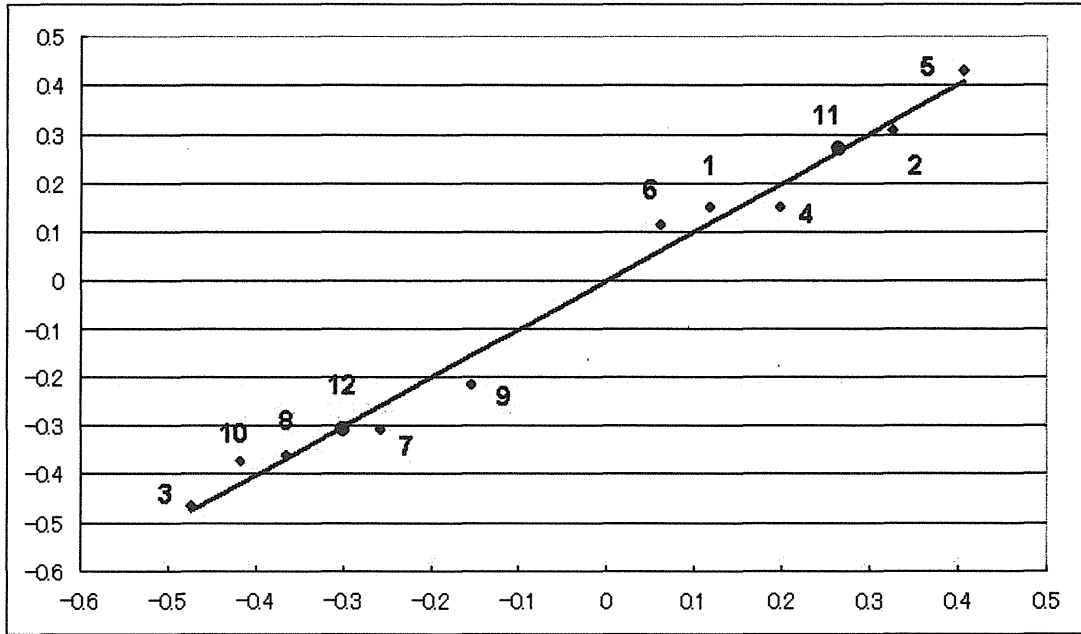


Fig.3 2D-QSAR 法:縦軸は活性値の対数(-log 値), 横軸は 2D-QSAR 法による活性予測値

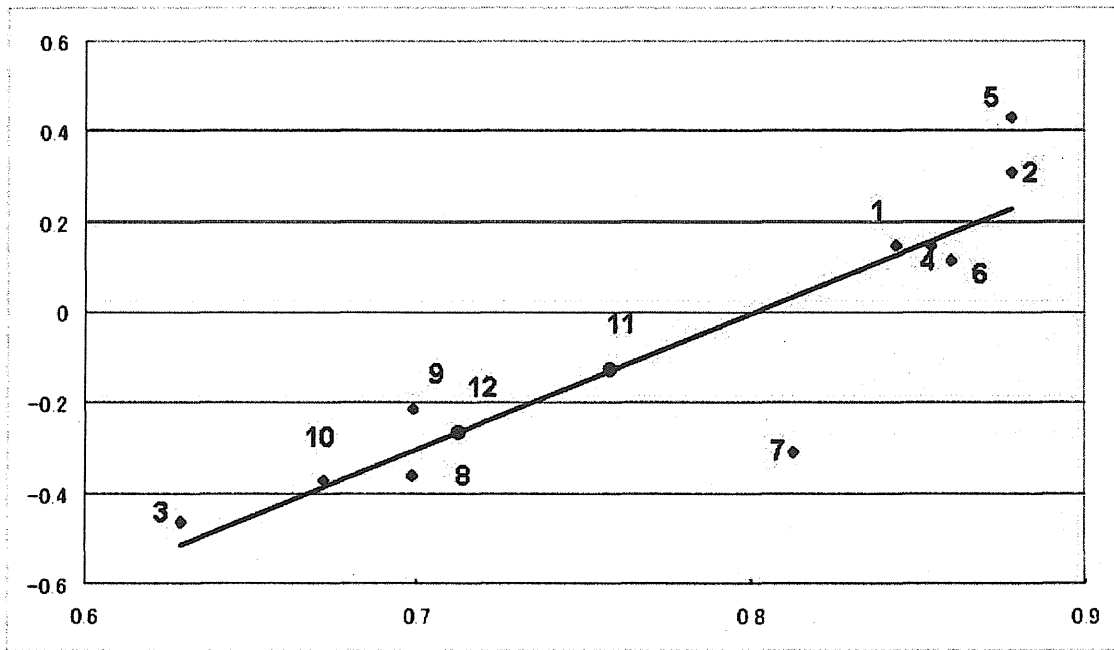


Fig.4 ファーマコフォアフィンガープリント法:縦軸は活性値の対数(-log 値)、横軸はファーマコフォアフィンガープリント法による構造類似性(相関係数の二乗  $R^2 = 0.804$ )

分担研究課題:違法ドラッグの中枢神経シナプス作用に関する薬理学的評価法

研究分担者:関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 部長

—マウス小脳スライス標本を用いた, 合成カンナビノイド系違法ドラッグの薬理作用評価—

研究協力者:入江 智彦 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官

研究要旨:違法ドラッグが持つ中枢作用性の蓋然性の高さを, 脳組織を用いた薬理学実験を行って定量的に評価し, 法規制の科学的根拠を迅速に示すことは, 薬物乱用による健康上の被害から国民を守ることに資する. 今年度は, 違法ドラッグの中でも特に合成カンナビノイド系化合物に絞って, マウス小脳スライス標本をモデルとして用いて神経伝達物質放出に対する抑制作用を検討し, 中枢作用性の定量的評価を行った. パッチクランプ法を用いて, 平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス後電流(EPSC)に対する合成カンナビノイドの抑制作用の用量依存性について定量的に測定した. 陽性対照薬である WIN 55,212-2 mesylate の EPSC の 50%阻害濃度(IC<sub>50</sub> 値)は 0.66  $\mu\text{M}$  であった. 次に最近, 違法ドラッグ中から検出された MAM-2201 に対して同様の実験を行ったところ, IC<sub>50</sub> 値は 0.53  $\mu\text{M}$  であった. この結果から MAM-2201 は興奮性シナプス伝達に対して陽性対照薬と同等かそれ以上の抑制作用を示すことがわかり, 強い中枢作用性を持つことが判明した. この結果は MAM-2201 の中枢作用性を, 脳スライス標本を用いた電気生理学的応答の測定実験で示した初めての報告である. MAM-2201 の中枢作用性の蓋然性の高さを, 実際の脳の反応性の変化に基づいて示しており, 法規制の対象とするための強い科学的根拠となる.

#### A. 研究目的

齧歯類の中枢神経系において, CB1 受容体が神経伝達物質放出に与える生理的影響の研究は, これまで小脳で盛んに行われており, CB1 受容体の細胞内シグナル伝達系が最も詳細に解明されてきた脳部位である<sup>1)</sup>. 本年度はマウス小脳スライス標本のプルキンエ細胞に, パッチクランプ法を適用して, プルキンエ細胞への入力線維を刺激した際に誘発される興奮性シナプス伝達に対する, 合成カンナビノイド系違法ドラッグの作用を定量評価することを試みた.

違法ドラッグの中枢作用性の蓋然性の高さを迅速に評価することは, 違法ドラッグの法規制の科学的根拠を提示する上で非常に重要である.

そこで, 本研究では脳内の内在性カンナビノイドが神経伝達物質放出を調節する生理現象を利用して, 違法ドラッグの中の合成カンナビノイド系化合物の中枢作用性を定量的に測定する実験を行った. 生体内にはカンナビノイド受容体として, CB1 受容体と CB2 受容体の 2 種類が存在するが, 中枢神経系には CB1 受容体のみが存在する<sup>1)</sup>. したがって, 合成カンナビノイド系の違法ドラッグが及ぼす幻覚などの中枢作用は, 中枢神経系の CB1 受容体に結合して作用を発揮するとされている<sup>1)</sup>. そこで, マウス脳スライス標本を用いて, 神経伝達物質放出に対する合成カンナビノイド系化合物の中枢作用性を定量的に評価できる *in vitro* 実験系の構築および, これを用いた違法ドラ

グの中枢作用性の蓋然性評価を試みた。脳スライス標本を用いた薬理実験法が、違法ドラッグが持つ中枢作用性の迅速な評価に利用可能であるかを検討した。

## B. 研究方法

3-5 週齢のマウス(ICR 系雄)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。

マウスをハロセンで深麻酔した後、直ちに断頭して安楽死させた。断頭後、小脳を素早く摘出して氷冷したModified Ringer液(234 (mM) sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>でバブリング)中に入れて5分間冷却した。氷冷Modified Ringer液で湿らせた濾紙上で小脳のトリミングを行い、小脳虫部のみの脳ブロックにした。脳ブロックをスライサーの皿に接着剤で固定してスライサーにセットし、氷冷Modified Ringer液を満たした。95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>でバブリングしながらスライサーで厚さ300 μmの小脳矢状断切片を作成した。切ったスライスにACSF(145 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 Mg Cl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glucose, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>でバブリング)の入った腰高シャーレに回収し、1時間以上室温でインキュベーションした後に実験に用いた。スライスを記録用のチャンバーにセットし、ACSF (100 μM Picrotoxin含有, GABA<sub>A</sub>受容体の阻害剤)を常に灌流させてスライスに新鮮なACSFを供給した。グルコン酸カリウムベースの細胞内液(125 K-gluconate, 10 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, 5 Na<sub>2</sub>-ATP, 5 Na<sub>2</sub>-phosphocreatine, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP, 5 QX-314, 10 HEPES-KOH, pH 7.3)を充填したパッチ電極でプルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。電位固定法で膜電位を-80mVに固定し、ACSFを充填したパッチ電極で小脳分子層を電気刺激して(Fig. 1), 平行線

維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス後電流(EPSC)を誘発した。パッチクランプ記録・解析には、Multiclamp 700B, Digidata 1440, pClamp10の組合せを用いた。EPSCは10秒間に1度の頻度で誘発した。尚、電気刺激を50 msec間隔で2回続けて与える刺激の組合せを1度の刺激とした。

陽性対照薬として、CB1 受容体のアゴニストである WIN 55,212-2 mesylate (別名(R)-(+)-WIN 55212,以下 WIN と省略)を用いた。被検物質としては、指定薬物である MAM-2201 (MAM, Fig.2; 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部提供)を用いた。各薬物は、DMSO に溶解したのち、各濃度になるように ACSF に溶かして用いた。この時の DMSO の濃度は高濃度でも各薬物が ACSF 中で溶解できるように 1%にした。EPSC を 10 分間記録した後、各薬物を含んだ ACSF を 10 分間灌流して薬物による EPSC の変化を記録した。記録の最後に AMPA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である DNQX (40 μM) を灌流することで、AMPA 型グルタミン酸受容体を介した EPSC を記録していたことを確かめた。

合成カンナビノイドによる、EPSC に対する 50% 阻害濃度(IC<sub>50</sub> 値)は次の通りに求めた。薬物灌流前の EPSC の大きさを 100 とした。薬物灌流後 9~10 分間の EPSC の大きさを灌流前の大きさを平均化した。平均化した大きさを Y 軸、薬物の濃度の常用対数をとったものを X 軸にプロットした。このプロットに対して  $Y=100/[1+10^{(X-\text{Log IC}_{50})}]$  の式で曲線をフィットさせて IC<sub>50</sub> 値を求めた。尚、このフィットは Graphpad Prism 5 ソフトウェアを用いて行った。

## C. 研究結果

平行線維の神経終末には CB1 受容体が局在しており、これの WIN による活性化はシナプス前終末からのグルタミン酸放出を抑制し、プルキンエ細胞で記録される EPSC の大きさが小さくなる事が知られている<sup>2)</sup>。本研究では、この興奮性シナプス伝達をカンナビノイド系の違法ドラッグの

評価系として用いることとした。まず初めに、陽性対照としてWINを用いてCB1受容体の阻害剤の平行線維-プルキンエ細胞間のEPSCに対する、50%阻害濃度(IC50)を測定出来るかどうかを検討した。EPSCを記録しながらWIN含有ACSFを灌流した所、WINの濃度依存的なEPSCの大きさの減少が観察された(Fig. 3A)。

指定薬物であるMAMは化合物の構造より、CB1受容体に対するアゴニストとして作用することが示唆される。そこで、次にMAMを用いてWINと同様の実験を行った。その結果、MAMはEPSCの大きさに対して、用量依存的な抑制作用を示した(Fig. 3B)。更に、CB1受容体のアンタゴニストであるAM-251(5  $\mu$ M)存在下において、MAMのEPSCに対する作用を検討した所、AM-251存在下ではMAMはEPSCに対して全く影響を与えなかった(Fig. 3C, MAM灌流前と比較したEPSCの大きさ,  $102.0 \pm 2.6\%$ ,  $n = 5$ )。

WIN灌流前のEPSCの大きさをControl値(100%)として、WIN灌流時のEPSCを平均化してプロットして、用量-作用曲線を作成した(Fig. 3D, 黒丸, 黒線)。このカーブフィッティングの結果、EPSCに対するIC50値は0.66  $\mu$ Mと算出された。また、MAMのIC50値は0.53  $\mu$ Mであった(Fig. 3D 灰色丸, 灰色線)。

この減少がシナプス前終末からのグルタミン酸放出の減少によることを確かめるために、50 msecの短い時間間隔で平行線維を2回連続電気刺激(paired pulse stimulation)して、その反応に対する薬理実験を行った(Fig. 4A, C)。WINを灌流した所、EPSCの大きさが小さくなると同時に、2番目のEPSCの大きさ/1番目のEPSCの大きさ(paired pulse ratio, PPR)が大きくなった。PPRが変化する場合はシナプス前終末からの神経伝達物質放出の放出確率が変化したことを示しており<sup>3)</sup>、1発目の刺激に対する応答が小さくなるが、2発目の刺激に対する応答は相対的に大きくなることから、WINによるEPSCの減少は神経伝達物質の放出の減少に起因しているといえる。また、

MAMの作用もシナプス前終末からのグルタミン酸放出減少であることも確認できた(Fig. 4B, C)。

これらの結果により、MAMは平行線維-プルキンエ細胞間のグルタミン酸放出とEPSC誘発の過程において、シナプス前終末に存在するCB1受容体にのみ作用してEPSCを減弱することが分かった。また、IC50値より、MAMはWINと同等以上の強い中枢作用性を持つことが分かった。

#### D. 考察

今年度は、小脳の平行線維-プルキンエ細胞間グルタミン酸シナプス伝達をモデルとして用いることで、合成カンナビノイド系違法ドラッグの中枢作用性に対する、定量的 *in vitro* 評価系を確立することが出来た。その結果、日本国内の違法ドラッグから検出されたMAM<sup>4)</sup>が、実際に中枢作用性を持っていることを定量的に示すことが出来た。この結果はMAMが中枢作用性を持つことを示した初めての結果であり、MAMの法規制のデータとして非常に有用である。また、MAMの類似化合物であるAM-2201やEAM-2201が日本内外の違法ドラッグから検出されているが<sup>4), 5)</sup>、これらも同様に強い中枢作用性を持つことを強く示唆している。

今回用いた陽性対照はWINのみであったが、次年度は、代表的な合成カンナビノイド系違法ドラッグであるJWH-018も陽性対照として用い、JWH-018とMAMの興奮性グルタミン酸伝達に対するIC50を直接比較することが重要であると考える。

また、今年度はグルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達に対する影響を測定したが、中枢のもう一つの主要な伝達物質であるGABA作動性抑制性シナプス伝達に対する作用は未検討である。小脳の抑制性介在ニューロン-プルキンエ細胞間のGABA作動性抑制性シナプスには、シナプス前終末にCB1受容体があり、このシナプス伝達もWINによるCB1受容体の活性化で減弱すること

が知られている<sup>1)</sup>。それゆえ、次年度以降は GABA 作動性抑制性シナプス伝達に対する MAM の作用も検討する必要がある。これにより、中枢神経系の主な 2 つの神経伝達であるグルタミン酸と GABA の放出に対して、合成カンナビノイド系違法ドラッグが及ぼす作用を総合的に検出することが出来るようになると考えられる。これにより、法規制に必要な科学的根拠に加えて、合成カンナビノイド系違法ドラッグを摂取した人における、行動異常や運動機能障害などを説明することができるデータの提示にも貢献できると期待できる。

#### E. 結論

今年度は、マウス小脳スライス標本とパッチクランプ法を組み合わせることで、合成カンナビノイドの興奮性神経伝達に対する抑制作用を定量的に評価できる実験系を確立した。これにより、指定薬物である MAM の IC<sub>50</sub> 値を陽性対照薬と直接比較することも行うことができた。本手法により、合成カンナビノイド系違法ドラッグの中枢作用性を定量評価法として、新規に発見される違法ドラッグに適応していくことで、法規制に必要な科学的根拠の提示に貢献できると考えられる。

#### F. 参考文献

- 1) Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. *Physiol Rev.* **89**(1):309-80 (2009).
- 2) Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M. *J Neurosci.* **26** (11): 2991-3001 (2006).
- 3) Zucker RS, Regehr WG. *Annu Rev Physiol.* **64**:355-405 (2002)
- 4) Uchiyama N, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y. *Forensic Sci Int.* (2012)
- 5) Logan BK, Reinhold LE, Xu A, Diamond FX. *Forensic Sci Int.* **57**(5) 1168-1180 (2012)

#### G. 健康危険情報

なし。

#### H. 研究発表

学会発表

1. 原宏士朗, 藤枝智美, 入江智彦, 三輪秀樹, 岡淳一郎, 白尾智明, 花尻-木倉瑠理, 合田幸広, 関野祐子: 光学的測定法により解析した扁桃体における神経応答に対するカンナビノイドの作用, 第 90 回日本生理学会, 東京 (2013.3).
2. 原宏士朗, 門間和音, 藤枝智美, 岡淳一郎, 渡邊俊樹, 白尾智明, 関野祐子: 光学的測定法により解析した扁桃体外側核における興奮/抑制バランスに対するカンナビノイドの作用, 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋(2012.9).

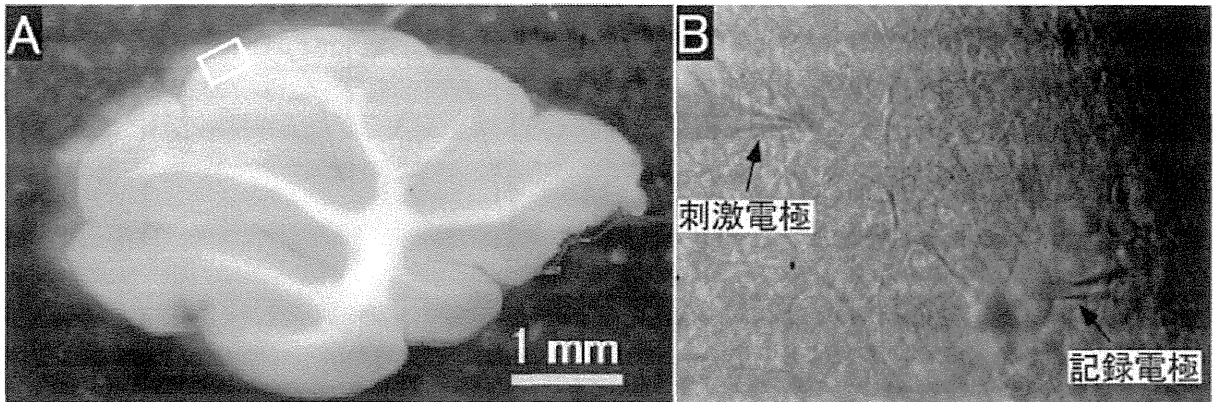


Fig. 1. マウス小脳スライス標本の写真. A: 白い部分が白質であり, プルキンエ細胞の軸索から構成される. 肌色の箇所が小脳皮質に相当する. B: 正立顕微鏡下でのパッチクランプ法による記録. A の四角で囲った小脳皮質の部分を拡大したのが B である. プルキンエ細胞の細胞体から記録電極で記録を行うと同時に, 刺激電極で分子層 (プルキンエ細胞の樹状突起のある層, 平行線維が走行している) を電気刺激している写真. 画像は約 400 倍に拡大した画像をモノクロ CCD カメラで撮影した.

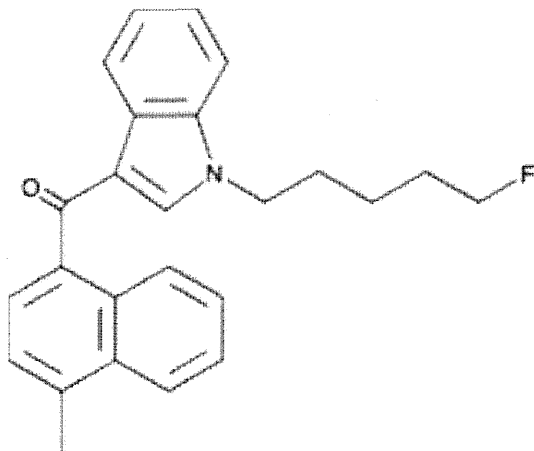


Fig. 2. MAM-2201 (MAM) の構造式

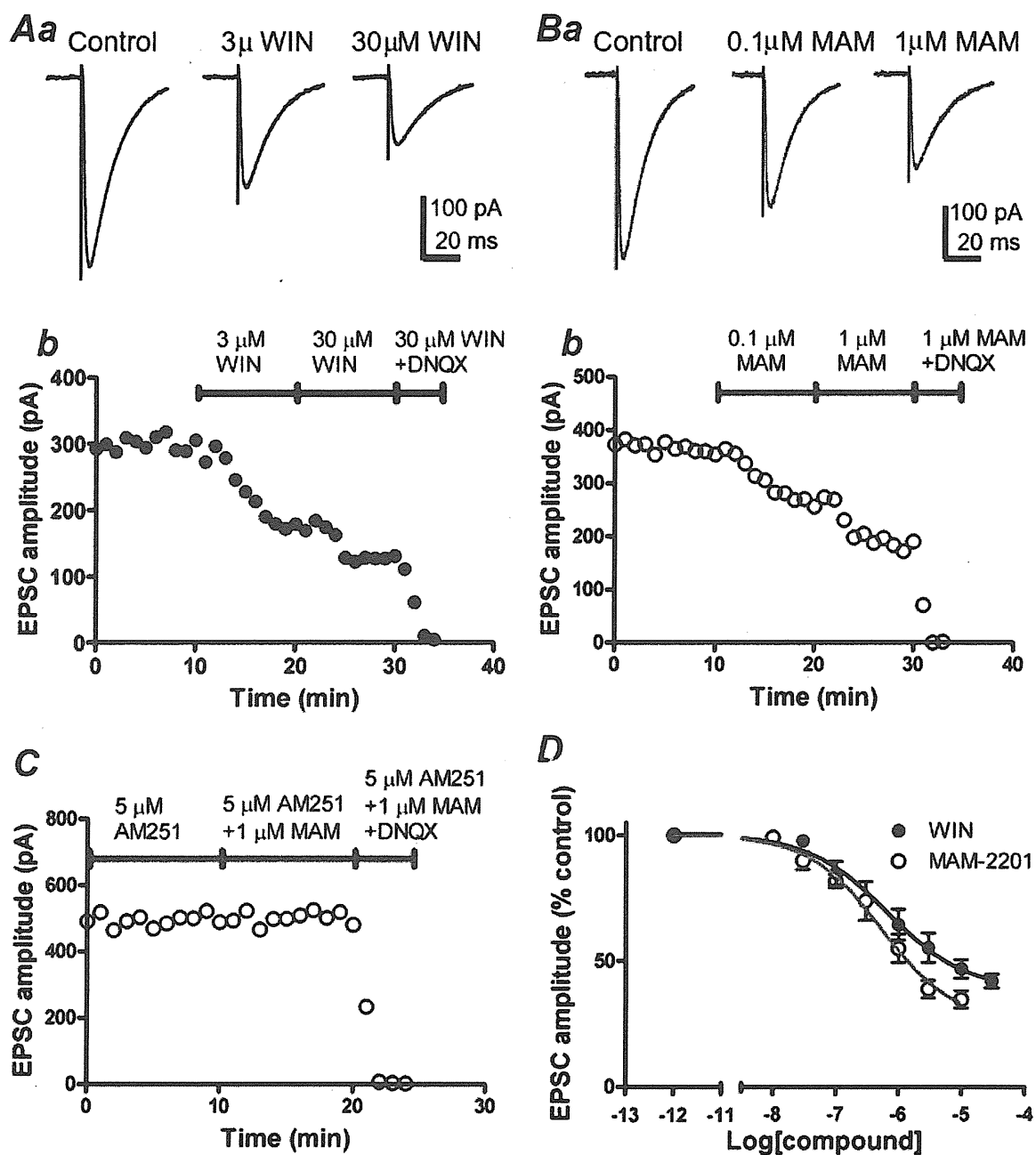


Fig. 3. WINとMAMの平行線維-プルキンエ細胞間EPSCに対する用量依存的な抑制作用。  
 Aa, Ba: トレースは連続した6回の記録(=1分間の記録)を平均化したものを表示してある。Ab, Bb: 横軸を時間として、1分間のEPSCの平均の大きさをプロットしてある。DNOXは40  $\mu\text{M}$ で用いた。C: AM-251存在下でのMAMの作用。D: WINとMAMのDose-response curve。コントロール(薬物投与前)の時のWPACの大きさは、化合物の濃度が $10^{-12}$  Mとみなしてプロットした。



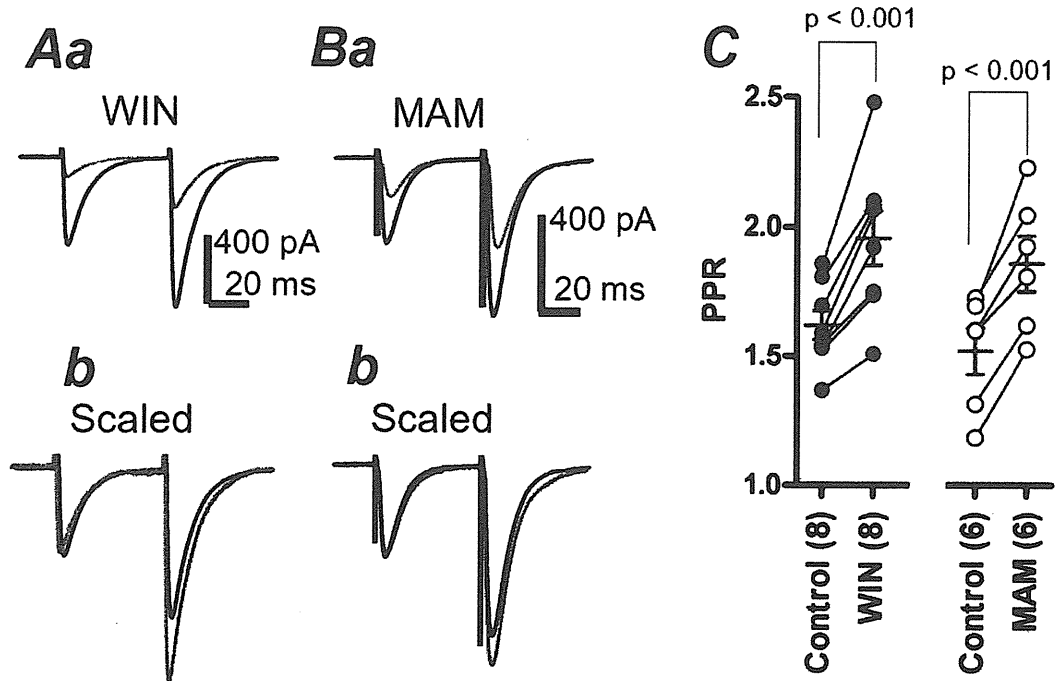


Fig. 4. Paired pulse stimulation 時における, WIN と MAM による PPR (paired pulse ratio) の変化.

Ab と Bb は, それぞれ Aa と Ba における薬物灌流後のトレース(グレートレース)をスケールしてコントロール(黒トレース)に重ね合わせたもの. C: PPR の比較. 平均値±SEM はグレーの線で表した.  $p < 0.001$  by paired *t*-test.

分担研究課題:違法ドラッグ成分の脳波による作用評価

分担研究者:裏出 良博(財)大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物学部門・研究部長

研究協力者:内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

ーカチノン系化合物  $\alpha$ -PVP 及び合成カンナビノイド MAM-2201 の  
ラットの脳波に及ぼす作用に関する研究ー

研究要旨:我々は、違法ドラッグ成分の中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚等の作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを用いて、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討している。今回、平成 24 年度違法ドラッグ成分として多くの製品から検出されたカチノン系化合物  $\alpha$ -PVP(平成 25 年 3 月より麻薬指定)及び合成カンナビノイド MAM-2201(平成 25 年 5 月より麻薬予定)について検討を行った。 $\alpha$ -PVP, MAM-2201 を単独、または両化合物を混合したものを、それぞれラットの腹腔内に投与し、脳波および自発運動量の変化について検討を行った。その結果、 $\alpha$ -PVP はラットの自発運動量を有意に増加させるとともに、ラットの脳波に有意な変化を与えた。従って、 $\alpha$ -PVP は興奮作用を有することが示された。一方、MAM-2201 はラットの自発運動量に有意差はほぼ見られなかったが、脳波に対しては有意な変化が認められた。次に、 $\alpha$ -PVP と MAM-2201 を混合投与した場合、投与初期に自発運動量を有意に増加させ、その後有意に減少させた。また、投与 2 時間後からラットの脳波に有意な変化を与え、その変化は MAM-2201 と類似のスペクトルパターンを示した。従って、両化合物を混合投与した場合、先に  $\alpha$ -PVP の作用が発現し、その後遅れて MAM-2201 の作用が発現すると考えられた。さらに、いずれの場合もラットの脳波に有意な変化が生じた。

A. 研究目的

乱用が懸念される違法ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を的確に把握し評価することが重要である。しかし、現状では違法ドラッグに関する科学的知見は少なく、また作用についても不明な点が多い。これまで我々は、違法ドラッグ成分の中樞神経系の興奮若しくは抑制又は幻覚作用を検出する方法として、動物実験用脳波解析システムを導入し、動物の脳波の変化から薬物の薬理学的効果を判定する方法を検討してきた<sup>1-6)</sup>。

最近の違法ドラッグ市場において、大麻様の鎮静等の薬理作用を有する合成カンナビノイドや

興奮作用を有するカチノン系化合物が違法ドラッグ成分として多くの製品から検出されるようになった。平成 24 年度違法ドラッグ成分として、多くの製品から検出されたカチノン系化合物  $\alpha$ -PVP(平成 25 年 3 月より麻薬指定)及び合成カンナビノイド MAM-2201(平成 25 年 5 月より麻薬予定)は、昨年自動車事故を起こした運転者が使用した違法ドラッグ製品中に検出された化合物である(Fig. 1)。また、最近の流通製品では、カチノン系化合物と合成カンナビノイドが同一製品から検出される例も多く見られる<sup>7,8)</sup>。しかし、これら両化合物の詳細な薬理データが乏しいことから、本研究では、 $\alpha$ -PVP 及び MAM-2201 を選定し、ラットに対する

脳波および自発運動量の変化について検討を行った。さらに、両化合物を混合投与した場合の作用についても検討を行った。

## B. 研究方法

【使用動物】Sprague-Dawley ラット(オス, 生後 8 週, 体重 290-350g)を日本エスエルシー株式会社より購入した。

【飼育方法】ラットは防音チャンバー内に設置したアクリル製ゲージで個別に管理した。12 時間ごとの明暗周期(午前 9 時より明期開始)下で, ラット用固形飼料を与え, 飼料と水を自由に摂取させた。

【脳波・筋電位測定用電極の処理手術と測定装置への接続】ラットに脳波・筋電位測定用の電極の留置手術を実施し, 回復用チャンバーに 10 日間おいて回復させた。その後, 記録用チャンバーに移して電極に測定用ケーブルを接続し, 4 日間順応させた。

【薬物投与】 $\alpha$ -PVP は生理食塩水に溶解させ, MAM-2201 及び混合溶媒は, DMSO/emurphor® EL-620(GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水(1/1/18)の溶媒に溶解させ, SD ラットに腹腔内投与(intraperitoneal administration: i.p.)した。投与は 10:00(明期開始時刻 9:00)に行い, 1 日目は溶媒単独のコントロールとして, Vehicle(溶媒)のみを投与し, 2 日目に薬物を投与した( $n = 3\sim 4$ )。 $\alpha$ -PVP 及び MAM-2201 は Cayman chemical 社から購入した。 $\alpha$ -PVP 及び MAM-2201 は, それぞれ 5 mg/kg ずつ投与し, 両化合物混合溶液の場合, 各薬物濃度 2.5 mg/kg となるように投与した。

【脳波・筋電位の記録と解析】脳波および筋電位は増幅(脳波:0.5-35 Hz, 筋電位:16-128 Hz)後, サンプリング速度:128 Hz でデジタル化して記録した。解析は脳波記録ソフトウェア'Sleep Sign'(キッセイコムテック社製)を用いて, 10 秒間のデータを 1 エポックとし, 脳波と筋電位の周波数成分・波形について, 投与後 24 時間にわたる脳波データを解析した。また, 脳波のパワースペクトルの

FFT (Fast Fourier Transform) 解析を行い, 0.5 時間毎の各段階における周波数 (0.5 - 34.5 Hz) の強度について, 1 日目のコントロールを 100 % として相対強度を算出し, 各薬物を比較した。

【自発運動量測定】自発運動量の測定は, 脳波・筋電位の測定と同時にを行い, 赤外線センサーによりラットの行動量を測定した。投与後 24 時間にわたるデータを解析し, 0.5 時間毎の自発運動量を算出した。

(倫理面の配慮)

動物実験は, 大阪バイオサイエンス研究所の「動物実験に関する指針」を厳守し, 動物福祉の観点に基づいて, 適切な実験計画, 実験手技のもとで実施した。

## C. 研究結果および考察

【自発運動量に及ぼす作用】 $\alpha$ -PVP 及び MAM-2201 をそれぞれ 5 mg/kg ずつ投与し, 両化合物混合溶液を 2.5 mg/kg 投与した場合の自発運動量の経時変化を, Fig. 2A-2C に示した。 $\alpha$ -PVP を 5 mg/kg 投与した場合, 6 時間後まで有意に自発運動量は増加した(Fig. 2A)。従って,  $\alpha$ -PVP は 6 時間に渡り興奮作用が持続すると考えられた。これは, 以前報告した, 興奮性フッ素置換アンフェタミン誘導体かつ指定薬物である 4-Fluoroamphetamine (4-FMP, Fig. 1) や *N*-Methyl-4-fluoroamphetamine (*N*-Methyl-4-FMP)を投与した際の興奮作用とほぼ同程度の持続時間であった<sup>1,2)</sup>。また, MAM-2201 を 5 mg/kg 投与した場合, 自発運動量に有意差は見られなかったが, 投与 20 時間後に若干の有意な減少がみられた(Fig. 2B)。次に, 両化合物混合溶液(2.5 mg/kg)投与の場合は, 6 時間後まで有意に自発運動量は増加し(Fig. 2C), 逆に 10.5 時間から 15 時間後まで自発運動量は有意に減少した(Fig. 2C)。この結果から,  $\alpha$ -PVP 及び MAM-2201 を混合投与した場合, 先に  $\alpha$ -PVP の作用が発現し, その後 MAM-2201 の作用が発現すると考えられた。

次に, 各薬物の投与 0.5~24 時間後のラットの

合計自発運動量を比較した (Fig. 3A, 3B). 縦軸は、1 日目のコントロールの合計運動量を 100 % として算出した相対合計運動量を示す.  $\alpha$ -PVP は、投与 24 時間後まで有意に合計運動量を増加させた. 特に、投与 9 時間後までは約 1100% と著しく増加した (Fig. 3A). 一方、MAM-2201 では、合計運動量に有意差は認められなかったが、投与 24 時間後に若干ではあるが有意な減少が見られた (Fig. 3B). さらに、両化合物を混合投与した場合、合計運動量は投与 12 時間後まで約 200~400% 程度増加した (Fig. 3B).

#### 【各周波数における脳波のパワースペクトル変化】

次に、各薬物投与後の脳波の各周波数における強度変化を検討した. 1 日目のコントロールの各周波数強度を 100 % とした時の薬物投与後の値を相対強度として算出し、各周波数における比較を行った. 投与 3 時間後及び 6 時間後までの 30 分毎の周波数強度率の経時変化を Fig. 4A~4F に示した.

$\alpha$ -PVP 投与群では、投与 3 時間後まで周波数 7.0~8.0 Hz 付近に共通して強度率の増加がみられ、逆に周波数 1.5~6.0 Hz および 10.0~16.0 Hz 付近では強度率の減少がみられた (Fig. 4A). また、投与 6 時間後までの場合も同様の傾向がみられた (Fig. 4D). 周波数 7.0~8.0 Hz の相対強度が最も増加したのは、投与 0.5~1 時間後であり、約 185% 増加した (Fig. 4A). 一方、MAM-2201 投与群では、投与 3 時間後まで周波数 4.0~5.5 Hz 及び 10.0~11.0 Hz 付近に共通して強度率の増加がみられた (Fig. 4B). また、投与 6 時間後までの場合も同様の傾向がみられた (Fig. 4E). 周波数 4.0~5.5 Hz 及び 10.0~11.0 Hz の相対強度が最も増加したのは、投与 0.0~0.5 時間後であり、それぞれ約 220%, 165% 増加した (Fig. 4E). さらに、両化合物投与群では、投与 2.0~2.5 時間後から周波数 4.0~5.5 Hz 付近に共通して強度率の増加がみられ (Fig. 4C), 投与 6 時間後までの場合も同様の傾向がみられた (Fig. 4F). 周波数

4.0~5.5 Hz の相対強度が最も増加したのは、投与 3.5~4.0 時間後であり、約 220% 増加した (Fig. 4F). また、両化合物混合投与群と MAM-2201 投与群のスペクトルパターンは比較的類似しており、さらに、混合投与群の周波数変化は MAM-2201 単独投与群と比較して、2 時間程度遅れて発現した (Fig. 4B, 4C). また、その変化は投与 11 時間後まで持続した (data not shown). 一方、混合投与群と  $\alpha$ -PVP 投与群に類似のスペクトルパターンは見られなかった (Fig. 4A, 4C).

以上の結果から、 $\alpha$ -PVP の自発運動量と脳波に対する作用の発現時間には相関が見られ、MAM-2201 の場合では相関が見られなかった. 通常、合成カンナビノイドを投与する場合は、暗期 (ラットの活動期) に投与し作用を検討することが多いが、今回は明期 (ラット休息期) に投与した. この場合、自発運動量の増加作用は評価しやすく、 $\alpha$ -PVP の有意な興奮作用は見られたが、抑制作用は評価しにくい. 従って、暗期 (ラットの活動期) 投与についても検討が必要であると考えられる. 一方、両化合物を混合投与した場合、自発運動量については投与 6 時間後まで有意に増加し、その後有意に減少した. また、脳波の周波数変化については、MAM-2201 投与群のスペクトルパターンと類似していたが、その作用は 2 時間程度遅れて発現した. 従って、 $\alpha$ -PVP の作用が発現した後、遅れて MAM-2201 の作用が発現すると考えられた. また、 $\alpha$ -PVP に起因すると考えられる自発運動量の増加作用の持続時間内に、MAM-2201 と類似の脳波の変化が発現したことから、両化合物は投与約 2 時間後から同時に作用していると考えられた (Fig. 2C, 4F). このように、両化合物の作用発現時間が異なる原因は不明であるが、カチノン系化合物  $\alpha$ -PVP と合成カンナビノイド MAM-2201 は構造が全く異なることから、各化合物の組織移行性や代謝速度なども異なると考えられる.

次に、これまでに測定した各種化合物投与後のラットの脳波パターンの比較を行った (Fig. 5).

今回測定した  $\alpha$ -PVP, MAM-2201 及び両化合物混合投与、また、主に鎮静性麻薬である合成カンナビノイド:JWH-018 (Fig. 1), 興奮性指定薬物: 4-FMP の脳波パターンを Fig. 5 に示した<sup>14,6)</sup>。前述の通り、興奮作用を示した  $\alpha$ -PVP は周波数 7.0~8.0 Hz 付近に強度率の増加がみられ、これは、興奮性化合物 4-FMP の周波数帯域(8.0 Hz 付近)増加と類似を示した。また、MAM-2201 は周波数 4.0~5.5 Hz 及び 10.0~11.0 Hz 付近に強度率の増加がみられ、これは、同じく合成カンナビノイドである JWH-018 と類似のスペクトルパターンを示した。さらに、 $\alpha$ -PVP 及び MAM-2201 混合投与時では、投与 0.0~0.5 時間後までに顕著な変化はみられなかったが、投与 3.5~4.0 時間後では、周波数 5.5 Hz 付近に強度率の増加がみられた。これは、JWH-018 と類似の周波数帯域(5.5 Hz 付近)の増加であった。なお、4.0~8.0 Hz 付近の周波数は、一般的に  $\theta$  波といわれるレム睡眠(夢を見る睡眠)時に増加する帯域である。以上の結果から、薬物の種類によって脳波のパターンにある程度共通した傾向があると考えられた。

#### D. 結論

本研究により、カチノン系化合物  $\alpha$ -PVP はラットの自発運動量を有意にかつ顕著に増加させるとともに、ラットの脳波に有意な変化を与えた。従って、 $\alpha$ -PVP は興奮作用を有することが示された。一方、合成カンナビノイド MAM-2201 は、ラットの自発運動量に有意差はほぼ見られなかったものの、脳波に対しては有意な変化を与えた。次に、両化合物を混合投与した場合、投与初期に自発運動量が有意に増加し、その後有意に減少した。また、ラットの脳波に有意な変化を与え、その変化は MAM-2201 単独投与時と類似のスペクトルパターンを示した。従って、 $\alpha$ -PVP と MAM-2201 を混合投与した場合、先に  $\alpha$ -PVP の作用が発現し、その後遅れて MAM-2201 の作用が発現すると考えられた。さらに、いずれの場合もラットの脳波に有意な変化が生じた。この様に、薬理作用の

異なる化合物を同時投与することにより、単独投与時と異なる変化が見られた。従って、複数の違法ドラッグ成分を含有する製品を摂取することにより、複雑な作用が発現し、予想外の重篤な健康被害が生じる可能性も危惧される。また、鎮静、興奮など薬物の種類によって、ある程度共通した脳波パターンがあると考えられた。今後も引き続き、興奮薬、鎮静薬、幻覚薬等の中枢神経作用薬に関して脳波測定を実施し、薬物の中枢作用評価法を確立すべく検討を行う予定である。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究補助金(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)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 19 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 2) 厚生労働科学研究補助金(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)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 20 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用および血漿中薬物濃度に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 3) 厚生労働科学研究補助金(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)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 4) 厚生労働科学研究補助金(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)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 22 年度研究分担報告「合成カンナビノイドのラットの脳波に及ぼす作用に関する研究(2)」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 5) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器

- 器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に  
関する研究」平成 23 年度研究分担報告「麻  
薬成分ケタミン誘導體:メキセタミンのラット  
脳波に及ぼす作用に関する研究」(裏出良博,  
内山奈穂子)
- 6) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Matsumoto  
N., Huang Z.L., Urade Y., Goda Y. Effects of  
synthetic cannabinoids on  
electroencephalogram power spectra in rats.  
*Forensic Sci. Int.* (2012) 215:179-183.
- 7) 厚生労働科学研究補助金(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)  
「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び  
危害影響予測に関する研究」平成 24 年度研  
究分担報告「平成 24 年度前半買い上げ違法  
ドラッグ製品中の新規流通違法ドラッグ成分  
の同定」(内山奈穂子)
- 8) 厚生労働科学研究補助金(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)  
「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び  
危害影響予測に関する研究」平成 24 年度研  
究分担報告「平成 24 年度後半買い上げ違法  
ドラッグ製品中の新規流通違法ドラッグ成分  
の同定」(内山奈穂子)
- F. 健康危険情報:特になし.
- G. 研究発表:特になし.
- H. 知的財産権の出願・登録状況:特になし.

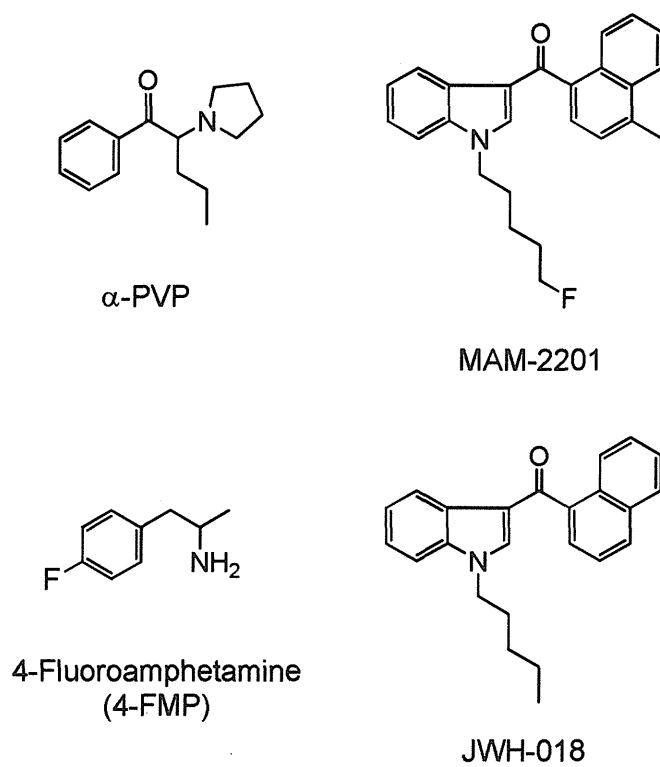
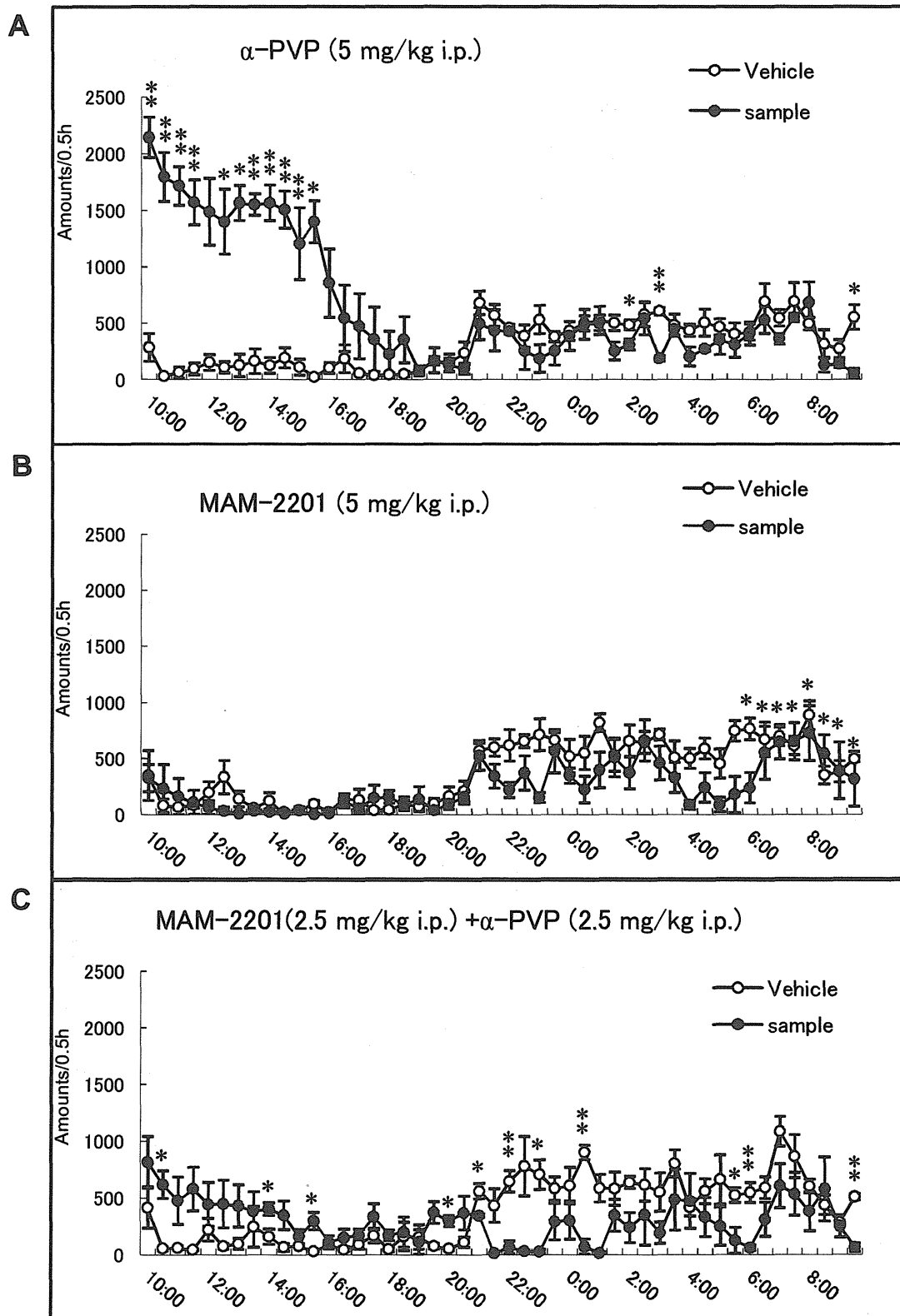


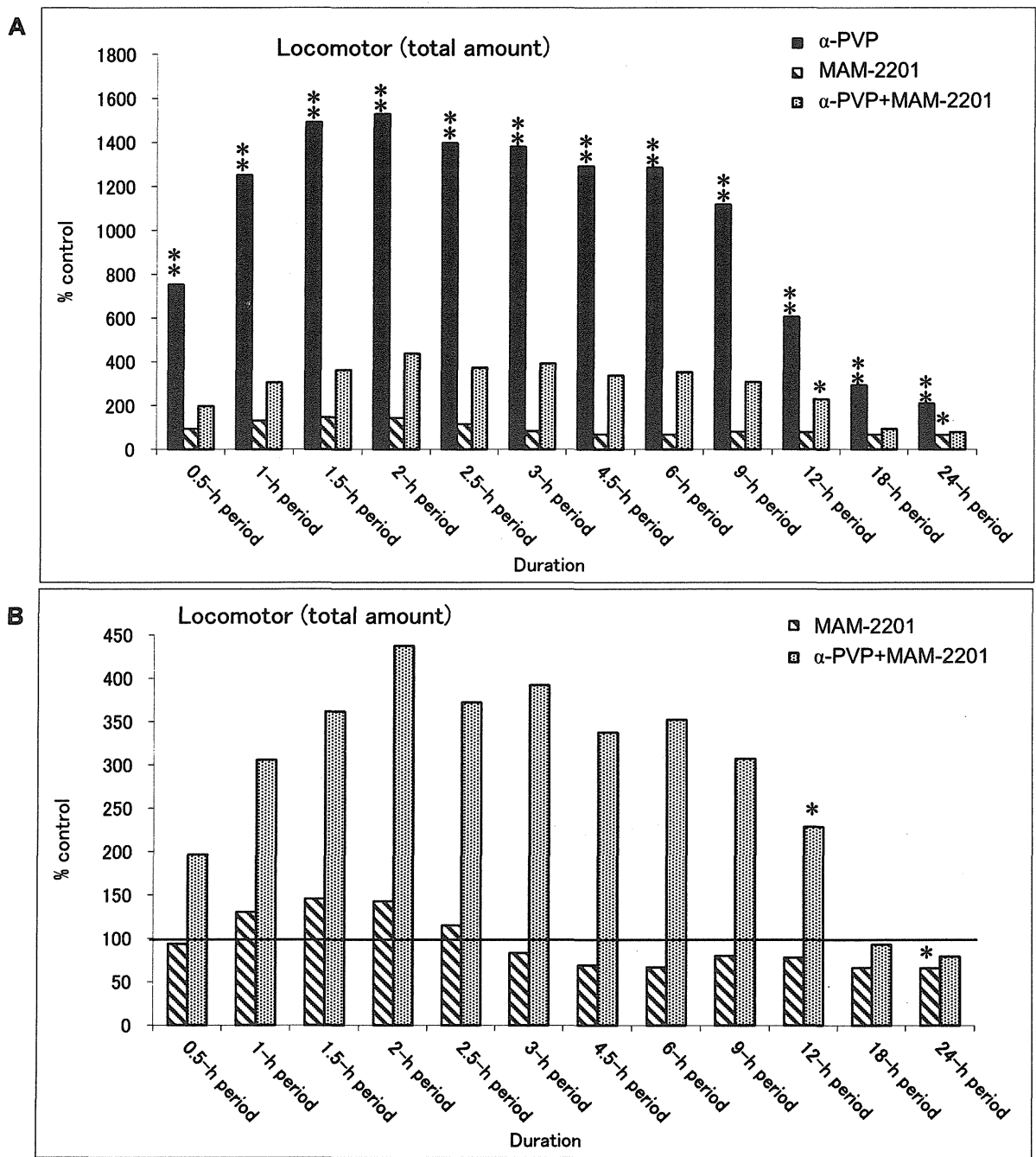
Fig. 1. Structures of tested ( $\alpha$ -PVP and MAM-2201) and related (4-FMP and JWH-018) compounds



n=3~4, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01

Fig. 2 薬物投与後のラットの自発運動量の経時変化





n=3~4, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01

Fig. 3 薬物投与0.5~24時間後の各薬物におけるラットの相対合計自発運動量

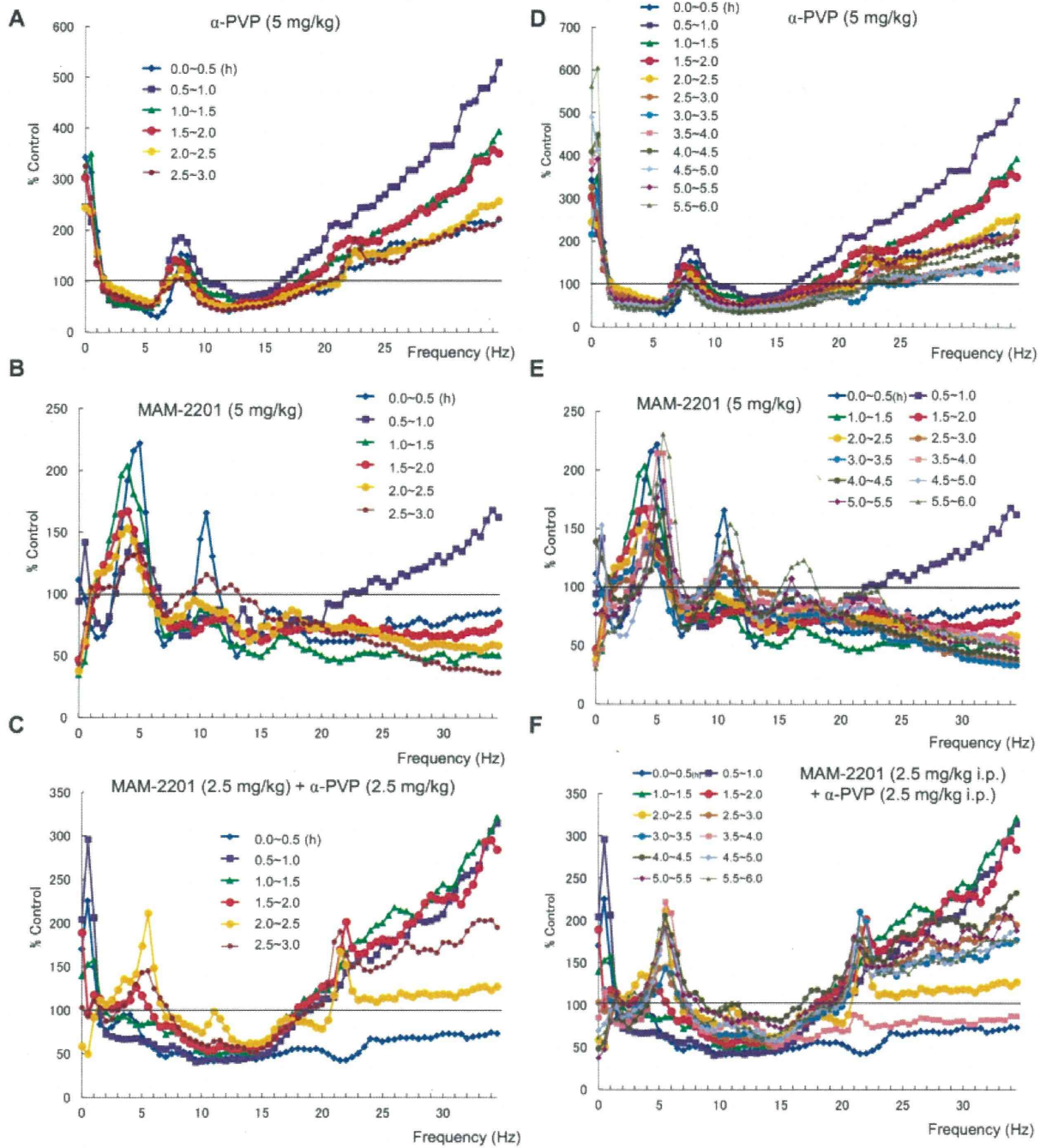


Fig. 4 薬物投与後ラットの各周波数での脳波のパワースペクトル変化

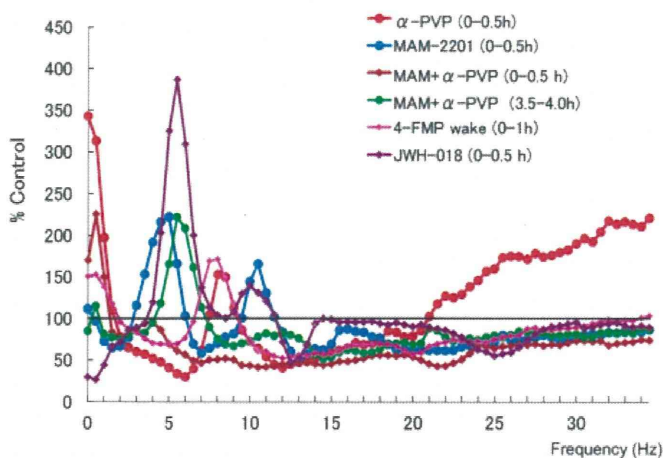


Fig. 5 各種薬物投与後ラットの各周波数での脳波のパワースペクトル変化

分担研究課題:違法ドラッグの中枢神経系に及ぼす影響評価  
分担研究者:和田 光弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
医療情報解析学研究室 准教授

— 違法ドラッグの中枢神経系に及ぼす影響評価 —

研究要旨: MDMA 及びメタンフェタミン(MP) 併用時における薬物の危険性評価を目的として, 拘束下のラットを MDMA 単独投与群 (12, 25 mg/kg), MP 単独投与群 (10 mg/kg), MDMA (12 mg/kg) 及び MP (10 mg/kg) 併用投与群の 4 群に分割し, 脳内におけるドパミン (DA) 及びセロトニン(5-HT) 及び脳内薬物の濃度をモニタリングした. その結果, 併用投与群の DA 濃度 ( $AUC_{0-600}$ : 243.4  $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ ) が, MDMA 単独投与群 (29.9  $\mu\text{M}\cdot\text{min}$  for 12 mg/kg; 123.4  $\mu\text{M}\cdot\text{min}$  for 25 mg/kg) と比較して有意に上昇した ( $P<0.05$ ). 一方, 5-HT は併用群では他群と比較して増加傾向を示したが, 有意差は見られなかった.

また, 併用投与群の MDMA の  $AUC_{0-600}$  (689.8  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ ) は MDMA 12 mg/kg 単独投与群 (348.0  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$ ) と比較して増加傾向を示し, 併用群の MP 滞留時間 (210.3 min) は MP 単独投与群 (123.0 min) と比較して有意な延長が観察された ( $P<0.05$ ). これらの結果から, MDMA を MP と併用すると健康被害が増悪する可能性が示唆された.

#### A. 研究目的

近年, 本邦における薬物情勢は厳しい状況にあり, 薬物乱用に起因する犯罪や中毒事故が後を絶たない<sup>1)</sup>. 合成麻薬 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) は主に錠剤として経口摂取され, 使用が手軽であるほか, カラフルな外観や表面に親しみやすい刻印を有していることから, 若年層での乱用が多いことが知られている<sup>2,3)</sup>. 本邦では, 全薬物事犯のうち, 覚せい剤事犯が検挙人員の大半を占めているが, MDMA 等の合成麻薬の乱用も依然として深刻な社会問題となっている<sup>1)</sup>.

MDMA は神経終末において主に 5-hydroxytryptamine (serotonin, 5-HT) 及び dopamine (DA) の放出促進作用及び再取り込み阻害作用により, 細胞間隙中の 5-HT 及び DA 濃度を上昇させる<sup>4-7)</sup>. また, MDMA 自身

が monoamine transporter (MAT) から神経終末に取り込まれ, 小胞性 MAT の取込み阻害作用, 代謝酵素のひとつである monoamine oxidase (MAO) の阻害作用などにより細胞質内のモノアミン濃度を高め, MAT を介して細胞間隙中に放出することにより濃度上昇が起こると考えられている<sup>4,7)</sup>. MDMA は MAT の中でも特に, serotonin transporter (SERT) との親和性が高く, 5-HT 放出促進作用及び再取り込み阻害作用が強いことが報告されている<sup>7-9)</sup>.

MDMA は覚せい剤である methamphetamine (MP) 及び麻薬であるメスカリンに類似した化学構造を有するため, 中枢興奮作用及び幻覚作用を併せ持つという特徴がある<sup>10)</sup>. MDMA を摂取すると多幸感が得られ, 社交性が増大したように感じるとされている<sup>10,11)</sup>. 一方, 身体症状として異常高熱や, それに伴い横紋筋融解症, 心疾患,

腎障害等が生じ、重篤な場合には死に至ることもある<sup>10-14)</sup>。これらの身体症状が生じるメカニズムは未だ解明されていないが、DA や 5-HT などの脳内アミンの関与が示唆されており、複数の因子の複雑な相互作用により引き起こされると考えられている<sup>7,15-17)</sup>。MDMA が中枢へ作用すること、また、その身体症状に脳内アミンの関与が示唆されることから、MDMA により生じる健康被害のメカニズムを解明する上で、脳内アミンを用いた評価は有用であると考えられる。

DA や 5-HT などの脳内アミンの定量には、HPLC-電気化学検出 (electrochemical detection, ECD) 法を用いたものが多く報告されている<sup>5,15-23)</sup>。この方法は誘導体化操作などの煩雑な前処理操作が不要であり、簡便かつ迅速な測定が可能となる。

また、*in vivo* における脳内アミンの経時的なモニタリングには、マイクロダイアリシス法が有用である<sup>5,15-20)</sup>。マイクロダイアリシス法とは、半透膜を介して、標的部位における内因性及び外因性物質の経時的な濃度変化を測定する手法であり、薬物動態及び薬効の解析や診断などに繁用されている<sup>24)</sup>。

MDMA 錠剤中には MDMA の他に、MP や、3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), amphetamine (AP), caffeine, ketamine など様々な薬物の混在が確認されている<sup>2,3,11,25-29)</sup>。さらに、複数の薬物を含む錠剤の割合は増加傾向にある<sup>29)</sup>。このことから MDMA 錠剤の服用により、意図せずに多剤乱用に陥る危険性がある。複数の薬物の同時摂取により毒性が増強することが懸念されるため、これらの薬物相互作用リスクの評価は健康被害を予測、予防する上で重要である。

そこで本研究では、MDMA 錠剤中に混在が確認されている MDMA と MP との相互作用リスクの評価を目的とし、MDMA 及び MP をラットに投与した際の DA 及び 5-HT の脳内濃度の変動を、マイクロダイアリシス法を組み合わせた

HPLC-ECD 法を用いて評価した。

さらに、本研究と同一試料中の MDMA, MP 及びそれぞれの代謝物である MDA, AP の定量を HPLC-蛍光 (FL) 法を用いて行っている<sup>33)</sup>。これらの結果を用いて、脳内の薬物が脳内アミンの挙動に及ぼす影響の検討を試みた。

なお、本研究で行った動物実験は、長崎大学動物実験委員会の承認を得て行った。

## B. 研究方法

MDMA 錠剤中に混在が確認されている MP との相互作用リスクを評価するために、MDMA 及び MP を単独投与または併用投与した場合の、脳内アミンに及ぼす影響を検討した。ラットに薬物を投与した後、マイクロダイアリシス法を用いて脳透析液を採取し、HPLC-ECD 法により脳透析液中の DA 及び 5-HT の同時定量を行った。

また、HPLC-FL 法により脳透析液中の薬物の定量を行った<sup>33)</sup>。薬物の毒性を評価するため、これらの結果を用いて脳内アミン放出量を決定する因子の検討を試みた。

### 1. HPLC-ECD 法

DA 及び 5-HT の測定に用いた HPLC-ECD システムの概略図及び測定条件を Fig. 1 に示す。システムには HTEC-500 を用いた。本システムの装置は送液ポンプ、デガッサ、恒温槽及び電気化学検出器が一体となっており、高感度な生体試料分析が可能である。試料注入後、カラムで分離し、電気化学検出器で検出、PowerChrom version 2.3 ソフトウェアを用いてピーク面積を算出し、定量を行った。

### 2. HPLC-FL 法による MDMA 類の定量

#### 2.1. HPLC 条件及びシステム

MDMA 類の測定には既報<sup>33)</sup>の HPLC-蛍光分析法を用い、今回用いたシステムは送液ポンプ 2 台、カラム、蛍光検出器からなっている。蛍光誘導体化した試料を注入後、一方のポンプで移動