

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的評価法

分担研究者:関野 祐子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 部長

-マウス小脳新鮮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を, 齧歯類脳組織を用いた *in vitro* 薬理学実験により定量的に評価し, 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. 今年度は昨年に引き続き, 合成カンナビノイド系違法ドラッグや対照物質をマウス小脳新鮮スライス標本に投与し, 神経伝達物質放出に対する抑制作用を測定する事により, 合成カンナビノイド系違法ドラッグの持つ中枢作用性の評価を行う事とした.

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に対する抑制作用の用量依存性について, 合成カンナビノイドの WIN, JWH-018, MAM-2201 の3つの化合物の違いを比較した. 近年流通が報告された MAM-2201 (平成 25 年 5 月 26 日麻薬指定) は, 代表的な合成カンナビノイド系違法ドラッグ JWH-018(平成 24 年 8 月 3 日麻薬指定) と比較すると, IC50 値が 1/3 であり, 同濃度でより強い抑制作用を示すことが分かった. また, MAM-2201 はプルキンエ細胞に入力する抑制性シナプス伝達に対しても濃度依存的に阻害作用を示した. 更に, プルキンエ細胞に入力する登上線維シナプスに対しても阻害作用を示し, 登上線維シナプス入力で生じる活動電位の発火様式にも影響を与えた. これらの結果は, MAM-2201 がヒトの小脳の運動機能ならびに運動学習機能に影響を及ぼす可能性を示しており, その中枢神経作用は他の麻薬よりも強いことを示唆している.

A. 研究目的

違法ドラッグの持つ中枢作用性を迅速かつ定量的に評価することは, 違法ドラッグの法規制の科学的根拠を提示し, これが人体に及ぼす有害作用を推定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という生理現象を利用して, 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的に測定する実験を行う事を考えた. 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. それゆえ, 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考えられている¹⁾. 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小脳新鮮スライス標本を用いて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もある¹⁾. 本年度は昨年度に確立した実験系²⁾を用い, 平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達に対する WIN, JWH-018, MAM-2201 の用量依存的な作用を定量評価した. 更には抑制性シナプス伝達への作用も検討すると同時に, 登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達

が減弱した結果引き起こされるシナプス後細胞の活動電位発生様式の変化を検討した。

B. 研究方法

3-5 週齢のマウス(ICR 系)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。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 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose, 95%O₂, 5%CO₂ 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%O₂, 5%CO₂ でバブリングしながらスライサーで厚さ 200 μm の矢状断小脳切片を作成した。切ったスライスには ACSF(145 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 Mg Cl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose, 95%O₂-5%CO₂ 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実験に用いた。スライスを記録用のチャンバーに移し、ACSF を常に灌流させてスライスに新鮮な ACSF を供給した。セシウムクロライドベースの電極内液(110 CsCl, 25 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.1 EGTA, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 0.3 Na₂GTP, 5 QX-314, and 10 HEPES, pH 7.3), またはグルコン酸カリウムベースの電極内液(125 K-gluconate, 10 KCl, 3 MgCl₂, 0.1 EGTA, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 0.3 Na₂GTP, 10 HEPES, 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。セシウムクロライドベース内液は電位固定法による記録に、グルコン酸カリウムベース内液は電流固定法による記録

に用いた。パッチクランプ記録・解析には、Multiclamp700B, Digidata1440, pClamp10 の組合せを用いた。陽性対照物質としては、CB1 受容体のアゴニストである WIN 55,212-2 mesylate [別名(R)-(+)-WIN 55212, (WIN)]と、代表的な違法ドラッグ JWH-018(国立医薬品食品衛生研究所 生薬部提供、既に麻薬指定されている)の 2 種類を用いた。被検物質としては、近年流通が始まった違法ドラッグ MAM-2201, (生薬部提供、ごく最近麻薬指定になった)を用いた。各薬物は、DMSO に 1 度溶解したのち、各濃度になるように ACSF に溶かして用いた。この時の DMSO の濃度は化合物が高濃度でも ACSF 中に溶解されるように 0.3%(v/v)とした。シナプス応答を 10~15 分間記録した後、化合物を含んだ ACSF を 10-15 分間灌流して変化の記録を開始した。

合成カンナビノイドによる、EPSCに対する50%阻害濃度(IC₅₀)の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10~11分間の興奮性シナプス後電流(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IC₅₀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。データの表記に関しては、IC₅₀値は平均値(95%信頼区間)で表記した。その他の値は平均値±標準誤差で表した。括弧内の数字は実験回数をしめす。

C. 研究結果

平行線維(parallel fibers, PF)がプルキンエ細胞と形成するシナプスにおいて、このシナプス前終末には CB1 受容体が局在しており、この受容体の WIN による活性化はグルタミン酸放出を抑制する。これは、プルキンエ細胞で記録される平行線維-プルキンエ細胞間の EPSC(PF-EPSC)の減少を引き起こす³⁾。昨年度に、この PF-EPSC を

合成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が可能である事を示した²⁾ので、今年度は PF-EPSC を指標として、WIN, JWH-018, MAM-2201 の 3 つの化合物の用量依存性の違い、及び IC50 値を比較した(Fig. 1). WIN と MAM-2201 のデータは昨年度の報告書に掲載したデータを引用した²⁾. MAM-2201 の PF-EPSC に対する抑制効果は、JWH-018 と比較して、薬物の濃度が 0.03, 0.1, 1, 3 μM それぞれの場合において有意に強いことが分かった(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by unpaired-t-test). WIN, JWH-018, MAM-2201 それぞれの IC50 値は、0.890 μM (0.296 to 2.68 μM), 1.12 μM (0.551 to 2.28 μM), 0.363 μM (0.193 to 0.681 μM), であり、MAM-2201 の IC50 値は JWH-018 の約 1/3 倍であった。

小脳皮質において、GABA はグルタミン酸と共に主要な神経伝達物質である。小脳皮質分子層に存在する抑制性ニューロンからプルキンエ細胞への抑制性シナプス伝達も神経前終末の CB1 受容体活性化により抑制される⁴⁾。また、抑制性ニューロンからプルキンエ細胞への抑制性入力 は運動学習の強化に必要であることが近年報告された⁵⁾。そこで、MAM-2201 の抑制性ニューロン-プルキンエ細胞間シナプス伝達への影響を、抑制性シナプス後電流(IPSC)の大きさの変化を指標として検討した(Fig. 2)。イオンチャネル型グルタミン酸受容体阻害下で IPSC の記録を行い、MAM-2201(10 μM)を投与した所、IPSC の減少が観察された(Fig. 2A)。また、この変化は濃度依存的であった(Fig. 2B)。IPSC を誘発する時、神経終末からの GABA 放出の減少によることを検討するために、50msec の短い時間間隔で分子層を 2 回連続電気刺激(paired pulse stimulation)して誘発を行った(Fig. 2Ab)。MAM-2201 を灌流した所、IPSC の大きさが小さくなると同時に、2 番目の IPSC の大きさ/1 番目の IPSC の大きさ(paired pulse ratio, PPR)が大きくなった。PPR が変化する場合に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いる⁶⁾ので、IPSC の減少はシナプス前終末からの GABA 放出の減少に起因していると考えられる。PPR 以外にシナプス電流の大きさの変動係数(coefficient of variation, CV)も、シナプス前終末からの伝達物質放出の変化の指標として広く使われている⁷⁾。CV の値を MAM-2201 の投与前後で比較した所、有意に CV 値が上昇していた(Fig. 2D, $p < 0.05$ by paired t-test)。これらの結果は、MAM-2201 は抑制性シナプス前終末に作用し、GABA 作動性シナプス伝達を抑制する事で IPSC が減少した事を示している。

小脳プルキンエ細胞には平行線維からのシナプス投射に加えて、下オリブ核から登上線維(Climbing fibers)と呼ばれる神経線維の投射を受ける⁸⁾。この投射は1本の登上線維のみにより行われ、強力な興奮性シナプスが形成される。登上線維からの情報入力は運動学習における誤差信号を伝達している⁸⁾。登上線維シナプスからの興奮性入力はプルキンエ細胞の細胞で活動電位を発生させる。この活動電位は、複雑スパイクと呼ばれ、複数の活動電位がまとまって生じる(この場合の個々の活動電位は”spikelets”と呼ばれる)特徴を示すが、このspikeletsは樹状突起でのCaスパイクを反映している⁹⁾。そして、プルキンエ細胞で生じた活動電位は長い軸索により小脳核ニューロンへと伝達される⁸⁾,¹⁰⁾。また、平行線維終末と同様に、登上線維終末にもCB1受容体が存在し、これの活性化はグルタミン酸放出抑制を引き起こす³⁾。そこで、登上線維を刺激して誘発される EPSC(CF-EPSC)と複雑スパイクの発火様式に対するMAM-2201の影響を検討した(Fig. 3, 4)。電位固定法により細胞体の膜電位を-10 mVに固定し、顆粒細胞層を電気刺激してCF-EPSCを誘発した(Fig. 3A)。PF-EPSCの場合と同様に、CF-EPSCの大きさはMAM-2201の投与により小さくなり(Fig. 3A)、これは用量依存性を示した(Fig. 3B)。PPRとCVもそれぞれ、MAM-2201により有意に増加したことから、この変化はシナプス前終末

からのグルタミン酸放出が減少したことが原因である事が分かった(PPR, $p < 0.01$; CV, $p < 0.05$ by paired t-test, Fig. 3C, D).次に, MAM-2201がプルキンエ細胞の内在的な膜興奮性・膜特性に影響を与えるか否かを電位固定法により検討した.興奮性/抑制性シナプス伝達を阻害した状況で,電流注入により膜特性を測定した(Table. 1).その結果,プルキンエ細胞の膜特性にはMAM-2201は影響を与えないことが確認できた.これは,プルキンエ細胞が細胞体にCB1受容体を発現しない事と良く一致する¹⁾.次に,電流固定法でプルキンエ細胞からパッチクランプ記録を行いながら登上線維を電気刺激して複雑スパイクを誘発し,これに対するMAM-2201の影響を検討した(Fig. 4). MAM-2201を投与して10分後以降に複雑スパイクの変化を投与前と比較した.複雑スパイクが示す spikelets の数は 3.50 ± 0.760 から 2.74 ± 0.724 へと有意に減少した($n = 11$, $p < 0.001$ by paired t-test, Fig. 4A, B). また, 1発目と2発目のspikelets間隔(between the 1st and 2nd spikes)と, 2発目と3発目のspikelets間隔(between the 2nd and 3rd spikes)のそれぞれは有意に増加した(Fig. 4C). これらの結果は, MAM-2201により, (1)プルキンエ細胞樹状突起でのCaスパイク及びCa²⁺流入の減少が減少する,(2)プルキンエ細胞から小脳核への活動電位伝播効率の低下と抑制性シナプス入力が減弱する,事を示唆している¹⁰⁾.

D. 考察

今年度は,昨年度確立した *in vitro* 違法ドラッグ中枢作用性定量評価系を用いて,代表的な違法ドラッグ JWH-018 と,近年違法ドラッグ市場に流通しはじめた MAM-2201 の両者が持つ中枢作用性を比較する事ができた(Fig. 1). その結果 MAM-2201はJWH-018よりも低濃度で平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス伝達を抑制する事が明らかとなった.この事は, MAM-2201 の人体に対する有害性は既存の違法ドラッグよりも高い事を強く示唆している.

また,昨年度は平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス伝達に対してのみ MAM-2201 の作用を検討したが,今年度は抑制性ニューロン-プルキンエ細胞間シナプス伝達に加え,登上線維-プルキンエ細胞間シナプス伝達への作用も検討する事ができた(Fig. 2, 3).その結果, MAM-2201 は両方のシナプスにおいて用量依存的にシナプス伝達を抑制することが明らかとなった.抑制性ニューロンからプルキンエ細胞への抑制性入力は運動学習の強化に必要なので⁵⁾, MAM-2201 による抑制性シナプス伝達の阻害は運動学習機能を妨げる方向に働き,人体の運動機能に重篤な影響を与える可能性を示唆している.

登上線維からプルキンエ細胞への入力は,運動学習における誤差信号を伝達している⁸⁾.この登上線維入力はプルキンエ細胞の樹状突起においてCaスパイクを誘発し,樹状突起内の細胞内Ca²⁺濃度上昇を引き起こす.これは小脳運動学習機能の発現に重要なシグナルとなる¹¹⁾.今回, MAM-2201 による登上線維-プルキンエ細胞間シナプス伝達の抑制の結果,プルキンエ細胞において複雑スパイクの発火様式に変化が生じることを見いだした(Fig. 4).複雑スパイクの spikelets は樹状突起でのCaスパイクを反映している⁹⁾ので, spikelets の減少は樹状突起におけるCa²⁺流入減少を引き起こしている可能性があり,この事は平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス可塑性にも影響を与える事を暗示している. MAM-2201 の投与により spikelets の減少に加え, spikelets の inter spike interval (ISI)の増加も観察された(Fig. 4C).プルキンエ細胞の活動電位発生様式の変化やプルキンエ細胞の脱落は,小脳失調を引き起こすが^{12), 13)},これに加えて spikelets の ISI の値と活動電位の軸索への伝播確率は正の相関がある事が知られている¹⁰⁾. MAM-2201 による spikelets の減少と ISI の増加は,それぞれ,活動電位発生様式の変化とプルキンエ細胞から小脳核への情報伝達効率の低下を意味しているので, MAM-2201 により小脳皮質

からの情報伝達は阻害されると共に, MAM-2201 の摂取は運動機能障害や小脳失調などの有害作用を引き起こすと考えられる。

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, 平成 25 年 5 月 26 日麻薬指定された MAM-2201 の中枢作用性を定量的に評価できた。この中で, (1)MAM-2201 は JWH-018 よりもより中枢作用性が強力である事と, (2)MAM-2201 は小脳プルキンエ細胞に入力する 3 種類のシナプス入力を阻害し, 複雑スパイクの発火様式にも影響を与える事, を見いだした。これらの結果は, MAM-2201 は中枢性作用を伴って人体に有害作用を示す事を強く示唆すると共に, 日本国内に既に流通し, 死亡事例も報告されている MAM-2201^{14, 15)}の人体に与える有害作用のメカニズムの理解に重要なデータとなるであろう。

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. 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 25 年度研究分担報告「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」(関野祐子)
3. Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M. *J Neurosci*. **26**(11): 2991-3001 (2006).
4. Kreitzer AC, Regehr WG. *J Neurosci*. **21**(20):RC174 (2001).
5. Wulff P, Schonewille M, Renzi M, Viltono L, Sassoè-Pognetto M, Badura A, Gao Z, Hoebeek FE, van Dorp S, Wisden W, Farrant

M, De Zeeuw CI. *Nat Neurosci*. **12**(8): 1042-1049 (2009).

6. Zucker RS, Regehr WG. *Annu Rev Physiol*. **64**:355-405 (2002).
7. Korn H, Faber DS. *Trends Neurosci*. **14**(10):439-445 (1991).
8. Ito M. *Physiol Rev* **81**, 1143-1195 (2001).
9. Schmolesky MT, Weber JT, De Zeeuw CI, Hansel C. *Ann N Y Acad Sci*. **978**:359-390 (2002).
10. Khaliq ZM, Raman IM. *J Neurosci*. **25**(2):454-463 (2005).
11. Konnerth A, Dreessen J, Augustine GJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(15):7051-7055 (1992).
12. Levin SI, Khaliq ZM, Aman TK, Grieco TM, Kearney JA, Raman IM, Meisler MH. *J Neurophysiol*. **96**(2):785-793. (2006)
13. Vogel MW, Caston J, Yuzaki M, Mariani J. *Brain Res*. **1140**:4-18 (2007).
14. Saito T, Namera A, Miura N, Ohta S, Miyazaki S, Osawa M, Inokuchi S. *Forensic Toxicol* **31**:333-337 (2013)
15. Uchiyama N, Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y. *Forensic Sci Int*. **227**(1-3):21-32 (2013).

G. 研究発表

学会発表

K. Hara, T. Fujieda, T. Irie, H. Miwa, J. Oka, T. Shirao, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda, M. Kurihara, Y. Sekino: Effects of cannabinoids on the neuronal responses in the mouse amygdala analyzed by voltage-sensitive dye imaging, Neuro2013 (2013.6, Kyoto).

論文発表 特になし

H. 知的所有権の取得状況

なし

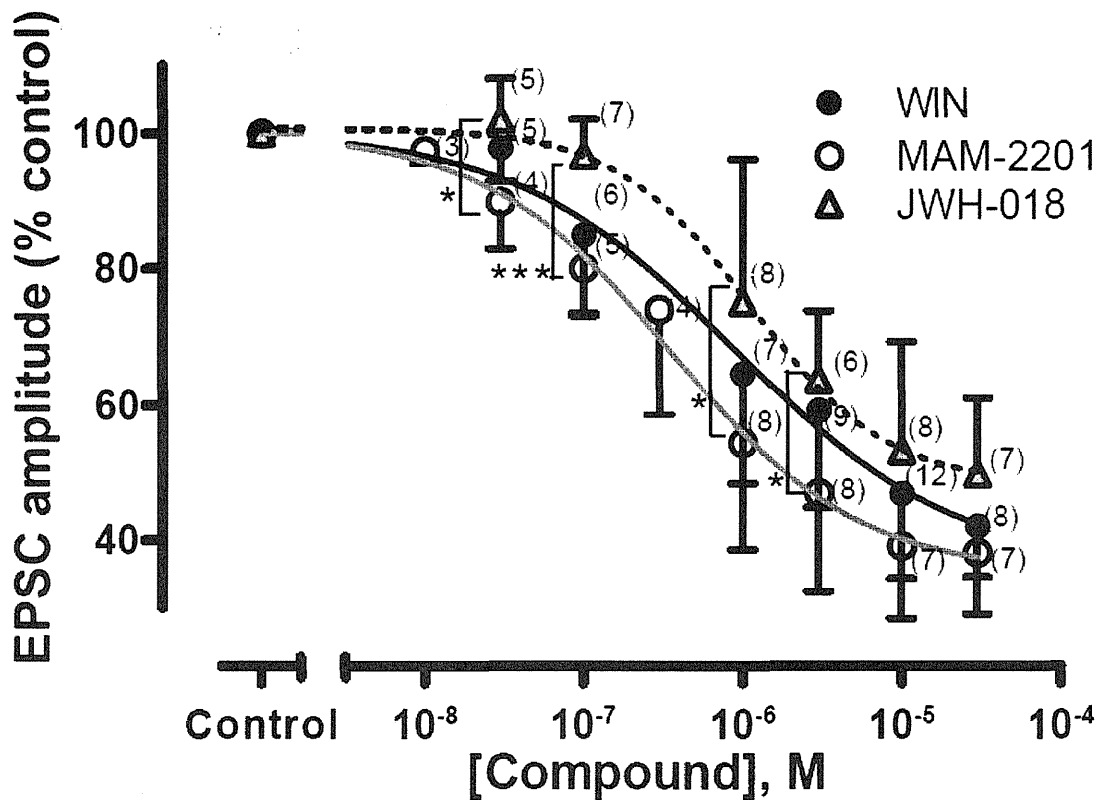


Fig. 1.

電位固定法によりプルキンエ細胞の膜電位を-80mV に固定し、小脳分子層を電気刺激して平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス後電流(PF-EPSC)を誘発した状況で、各種合成カンナビノイド化合物を投与して PF-EPSC に対する抑制効果を測定してプロットした。PF-EPSC は GABA_A 受容体を阻害した条件下で誘発した(100 μM Picrotoxin 存在下)。横軸:化合物(compound)の濃度を示している。縦軸:EPSC の大きさは、薬物投与前の値(=control)で平均化した。エラーバーと括弧内数字はそれぞれ、標準偏差と実験回数を示している。MAM-2201 と WIN 55,212-2 mesylate (WIN)のデータは昨年度の報告書のデータを用いた²⁾。*p < 0.05, ***p < 0.001 by unpaired t-test.

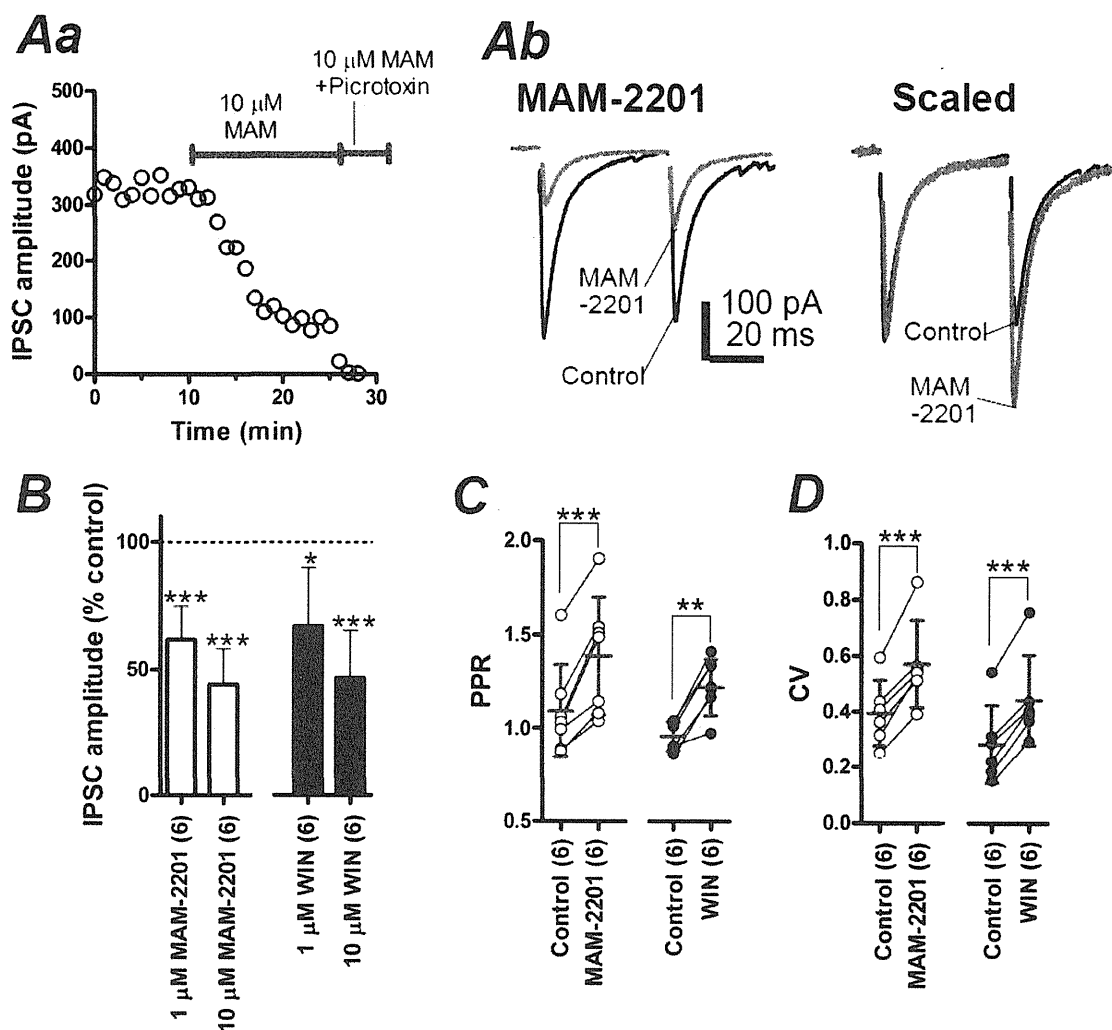


Fig. 2.

膜電位を-80 mV に固定して分子層を電気刺激して抑制性シナプス後電流(IPSC)を記録し、これに対する MAM-2201 の抑制効果を検討した。興奮性シナプス入力はいオンチャネル型グルタミン酸受容体の阻害剤(40 μ M DNQX)を細胞外液に加えてブロックした。各データは 10 秒間隔で断続的に記録した IPSC の 6 回分を平均したもの。Aa, MAM-2201 による IPSC 阻害のタイムコース。記録しているシナプス電流が GABA(A)受容体の活性化によることは実験の最後にこの受容体に対する阻害剤(picrotoxin)を投与することで確認をした。Ab, MAM-2201 投与前後の IPSC トレースの比較。B, IPSC に対する MAM-2201 と WIN(陽性対照薬)それぞれの濃度依存的抑制作用。薬物投与前の値を 100 として平均化した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by unpaired t-test. C, paired-pulse ratio (PPR)の薬物投与による変化。D, 変動係数(coefficient of variation, CV)の薬物投与による変化。** $p < 0.0$, *** $p < 0.001$ by paired t-test.

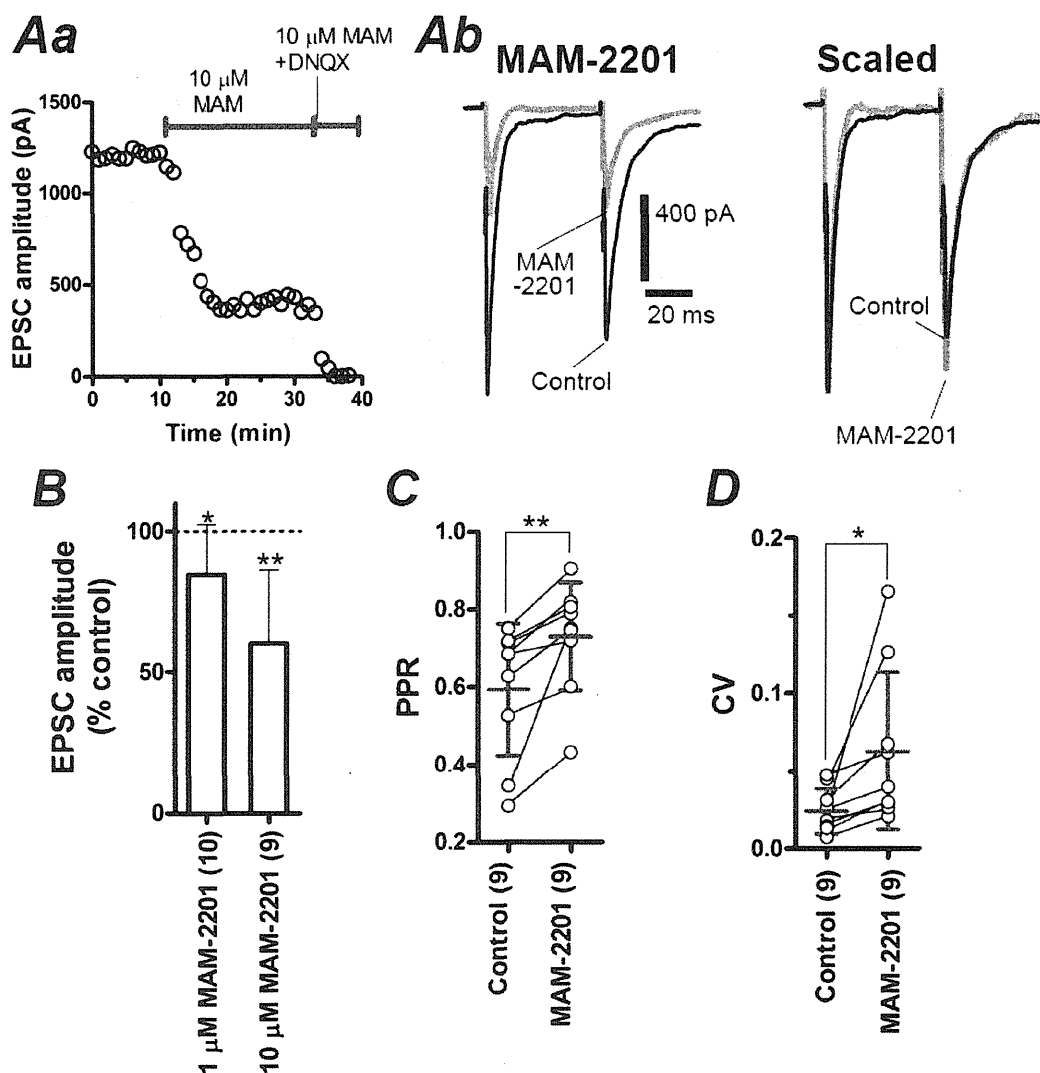


Fig. 3.

A, 膜電位を-10 mVに固定して顆粒細胞層を電気刺激し, 登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス後電流(CF-EPSC)を記録し, これに対する MAM-2201 の抑制効果を検討した. EPSC であることを確認するため, 記録の最後にイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の阻害剤である DNQX(40 μ M)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. CF-EPSC は PF-EPSC 記録の場合と同様に, 100 μ M PicROTOXIN 存在下で誘発した. 各データは 10 秒間隔で断続的に記録した CF-EPSC の 6 回分を平均したもの. Aa, MAM-2201 による CF-EPSC 阻害のタイムコース. 記録しているシナプス電流がイオンチャンネル型グルタミン酸受容体の活性化によることは実験の最後に阻害剤(40 μ M DNQX)を投与することで確認をした. Ab, MAM-2201 投与前後の CF-EPSC トレースの比較. B, CF-EPSC に対する MAM-2201 と WIN(陽性対照薬)それぞれの濃度依存的抑制作用. 薬物投与前の値を 100 として平均化した. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by unpaired t-test. C, paired-pulse ratio (PPR)の薬物投与による変化. D, 変動係数(coefficient of variation, CV)の薬物投与による変化. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by paired t-test.

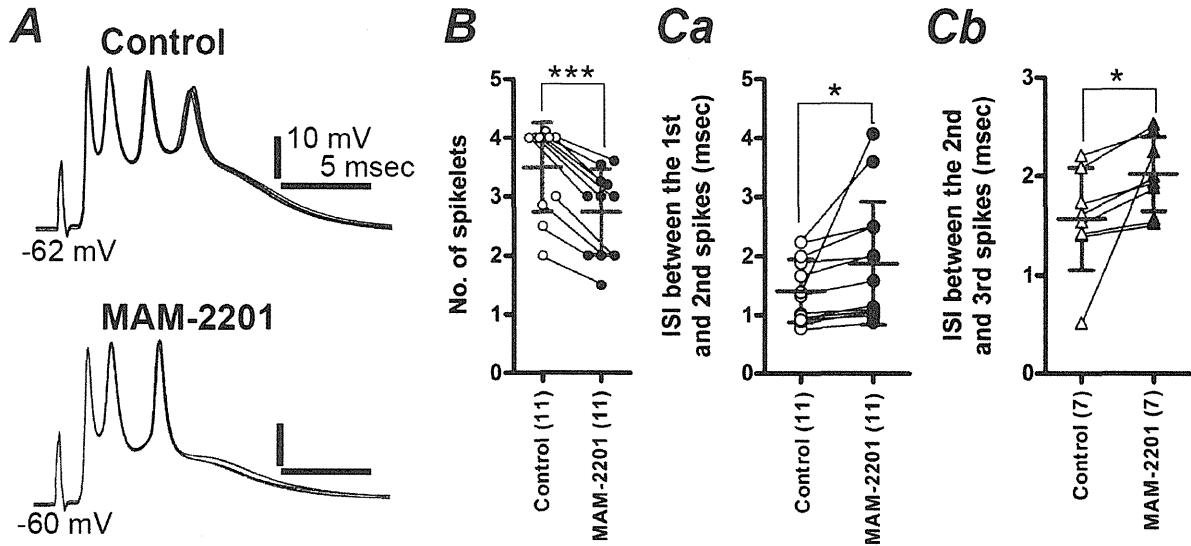


Fig. 4.

A, 電流固定下で膜電位を-60 mV に合わせた後、0.1 Hz で顆粒細胞層を電気刺激し、プルキンエ細胞において複雑スパイクを誘発した。これに対する MAM-2201 の作用を投与 10 分後に記録した(赤いトレース)。各トレースは連続した 5 回のトレースを重ねたものである。B, MAM-2201 投与による spikelets 数の変化。Spikelets の各点は複雑スパイク 10 回の平均値を用いた。C. 1 発目と 2 発目の spikelets との間隔 (between the 1st and 2nd spikes, Ca)と、2 発目と 3 発目の spikelets との間隔(between the 2nd and 3rd spikes, Cb)に対する MAM-2201 の影響。ISI: inter spike interval. ISI の各ポイントは複雑スパイク 10 回の平均値を用いた。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by paired t-test,

	Control (<i>n</i> = 10)	10 μ M MAM -2201 (<i>n</i> = 10)	<i>p</i> value
Resting membrane potential (mV)	-65.3 \pm 3.2	-66.0 \pm 3.5	0.43
input resistance (M Ω)	113 \pm 51	101 \pm 34	0.29
Threshold current (pA)	71.0 \pm 39.5	77.8 \pm 7.4	0.24
Threshold potential (mV)	-45.4 \pm 5.6	-44.9 \pm 6.4	0.50
Spike height (mV)	44.9 \pm 6.4	45.4 \pm 47.6	0.71
Maximum rate of rise (V/s)	114 \pm 40	131 \pm 37	0.20
Maximum rate of fall (V/s)	-93.0 \pm 17	-89.2 \pm 15.8	0.14
Firing frequency at 200 pA (Hz)	33.0 \pm 18.4	34.4 \pm 20.5	0.77
Firing frequency at 500 pA (Hz)	72.6 \pm 29.8	77.8 \pm 42.1	0.68

Data are provided as the means \pm standard deviation, and *n* = number of experiments.

Table 1.

MAM-2201 によるプルキンエ細胞の内在的な膜特性への影響検討のまとめ. 自発発火を抑えるために MAM-2201 投与前に電流注入により静止膜電位を-65 mV 付近に合わせて実験を行った. 実験はすべて電流固定法による電流注入刺激(500 msec の矩形波)により行った. paired t-test により検定を行った.

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 (公財)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

—新規流通合成カンナビノイド QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC 及び NNEI indazole analog のラットの脳波に及ぼす作用に関する研究—

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、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 24~25 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合成カンナビノイド:QUPIC, 5F-QUPIC, NNEI indazole analog (MN-18) (全て指定薬物)及び陽性対照 JWH-018 (麻薬)を、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、3 化合物はいずれもラットの自発運動量を有意に減少させ、特に QUPIC, 5F-QUPIC の抑制作用は JWH-018 より強力であった。さらに、3 化合物はいずれもラットの脳波に有意な変化を与え、その脳波パターンは JWH-018 と類似していた。また、QUPIC, 5F-QUPIC 及び JWH-018 については、自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関がみられたが、NNEI indazole analog については、両作用の発現時間に相関がみられなかった。

研究協力者

有竹浩介 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究
機構 (IIS)・准教授

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 [1-8]。

本研究では、平成 24~25 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合成カンナビノイド:QUPIC, 5F-QUPIC, NNEI indazole analog (MN-18) (指定薬物)及び陽性対照 JWH-018 (麻薬) (Fig. 1)を、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。

B. 研究方法

【使用動物】 Sprague-Dawley (SD)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、固形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】NNEI indazole analog (MN-18)は国立衛研において違法ドラッグ製品より単離、同定したものを使用し、QUPIC, 5F-QUPIC, JWH-018 は Cayman chemical 社製を使用した。各薬物は、DMSO/emurphor® EL-620 (GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水 (1/1/18)の溶媒に溶解させ、それぞれ 5 mg/kg ずつ SD ラットに腹腔内投与 (intraperitoneal administration: i.p.)した。投与は 19:00 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 = 3~4)。

【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。また、各投与 0-3, 0-6, 0-9, 0-12 時間後の累積量を、1 日目のコントロールを 100% として算出し、各薬物を比較した。

(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】QUPIC, 5F-QUPIC, NNEI indazole analog をそれぞれ 5 mg/kg ずつ投与した場合の投与後 0.5 時間毎の自発運動累積量の経時変化を、Fig. 2a-2d に示した。QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC を投与した場合、投与直後から自発運動量は減少し、それぞれ投与 8 時間、7 時間後まで有意に自発運動量が減少した (Fig. 2a, 2b)。また、NNEI indazole analog を投与した場合、投与 0.5 時間後までは自発運動量は増加したが、3 時間後から自発運動量が減少し始め、投与 5.5 時間後まで有意に自発運動量が減少した (Fig. 2c)。一方、陽性対照である JWH-018 について有意な自発運動量減少作用がみられたのは、投与 0.5 時間後までであった (Fig. 2d)。JWH-018 については、以前報告した通り、濃度依存的に自発運動量の減少作用が生じるものではなく、また、濃度によっては Δ^9 -THC よりも作用が弱いことがあった (JWH-018 を 2.5 mg/kg 投与した場合、4.5 時間後まで有意に自発運動量は減少した) [4]。

従って、一概に作用の強弱は判断できないが、今回の濃度では、QUPIC, 5F-QUPIC は、JWH-018 と比較してより強力かつ長時間にわたり自発運動量の抑制作用がみられた。また、NNEI indazole analog に関しては、投与直後から抑制作用がみられた QUPIC, 5F-QUPIC 及び JWH-018 とは異なり、投与直後は興奮傾向がみられ、その後、抑制作用が発現するまでに時間がかかった (Fig. 2c)。

次に、各薬物の投与 0-3, 0-6, 0-9, 0-12 時間後のラットの累積自発運動量を比較した (Fig. 3)。縦軸は、1 日目のコントロールの累積運動量を 100 % として算出した相対累積運動量を示す。QUPIC は、投与 0-9 時間後まで、コントロールと比較して 20~30% 程度まで合計自発運動量を有意に減少させた。5-Fluoro-QUPIC は、投与 0-6

時間後まで有意に合計自発運動量を減少させ、特に投与 0-3 時間後までは、4%程度と顕著な減少作用がみられた。一方、NNEI indazole analog は、投与 0-3 時間後までに有意差はみられなかったが、投与 0-6 時間後までの合計運動量は 70% 程度まで有意に減少した。陽性対照の JWH-018 は、投与 0-6 時間後まで、合計自発運動量を 40-60%程度まで有意に減少させた。従って、QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC は JWH-018 と比較してより強力な合計運動量の減少作用がみられた。また、NNEI indazole analog は、JWH-018 と比較して作用は弱いものの有意に自発運動量を減少させることが示された。

【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 時間後までの 30 分毎の周波数強度率の経時変化を Fig. 4a~4d に示した。

QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC 及び NNEI indazole analog 投与群では、投与 3 時間後まで周波数 5.0~6.0 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. 4a-4c)。周波数 5.0~6.0 Hz 及び 10.0~11.0 Hz 付近の相対強度が最も増加したのは、投与 0.0~0.5 時間後であった (Fig. 4a-4c)。また、これら 3 化合物投与群と JWH-018 投与群は類似の周波数スペクトルパターンを示した (Fig. 4d)。また、JWH-018 の周波数強度率が最も増加した時間も投与 0.0-0.5 時間後であり、3 化合物と同じであった (Fig. 4d)。また、NNEI indazole analog については、投与 3 時間後から自発運動量の抑制作用が発現したが、脳波のスペクトルパターンの変化は、投与 0.0-0.5 時間後からであった。従って、自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関はみられなかった (Fig. 2c, 4c)。

各薬物投与 0.0-0.5 時間後の脳波スペクトルパ

ターンを Fig. 5 に示した。前述の通り、QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC 及び NNEI indazole analog は類似のスペクトルパターンを示し、5.0-6.0 Hz 付近の周波数強度率はコントロールと比較して、それぞれ 600-700%程度増加した。また、これら 3 化合物と類似のスペクトルパターンを示した陽性対照の JWH-018 は、5.0-6.0 Hz 付近の周波数の最大強度率が 350%程度であり、QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC, NNEI indazole analog と比較すると低かった (Fig. 4d)。

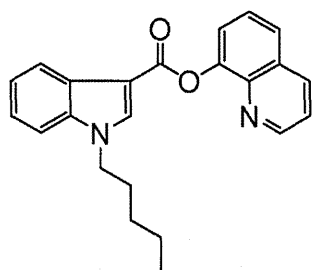
D. 結論

本研究により、合成カンナビノイド: QUPIC, 5F-QUPIC, NNEI indazole analog (MN-18) (全て指定薬物) は、いずれもラットの自発運動量を有意に減少させ、特に QUPIC, 5F-QUPIC の抑制作用は JWH-018 より強力であった。さらに、3 化合物はいずれもラットの脳波に有意な変化を与え、その脳波パターンは JWH-018 と類似していた。また、QUPIC, 5F-QUPIC 及び JWH-018 については、自発運動量の抑制作用と脳波の周波数変化の発現時間に相関がみられたが、NNEI indazole analog については、両作用の発現時間に相関がみられなかった。従って、今回検討した QUPIC, 5F-QUPIC など新規流通合成カンナビノイドの自発運動量抑制作用などの薬理作用が、既存の合成カンナビノイドである JWH-018 と比較して、より強力になっている傾向が示唆された。また、既報及び本研究から、合成カンナビノイドは、ある程度共通した脳波パターンの変化を起こすと考えられた [3, 4, 6-8]。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。

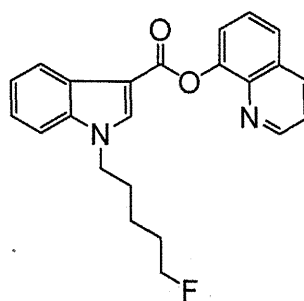
E. 参考文献

- 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

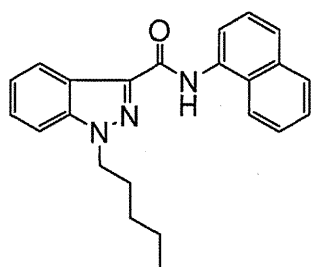
- 止対策に関する研究」平成 19 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 2) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの依存性等に基づいた乱用防止対策に関する研究」平成 20 年度研究分担報告「フッ素置換アンフェタミン誘導体のラットの脳波に及ぼす作用および血漿中薬物濃度に関する研究」(裏出良博, 内山奈穂子)
- 3) 厚生労働科学研究補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「違法ドラッグの危害影響予測手法と分析に関する研究」平成 21 年度研究分担報告「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体: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「カチノン系化合物 α -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」(内山奈穂子)
- 8) Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Aritake K., Goda Y., Urade Y. Effects of MAM-2201 and α -PVP on electroencephalogram power spectra and locomotor activity in rats. *SOFT2013* (2013.10)
- 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.



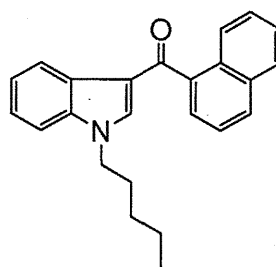
QUPIC
(PB-22)



5-Fluoro-QUPIC
(5-Fluoro-PB-22)



NNEI indazole analog



JWH-018

Fig. 1. Structures of tested compounds

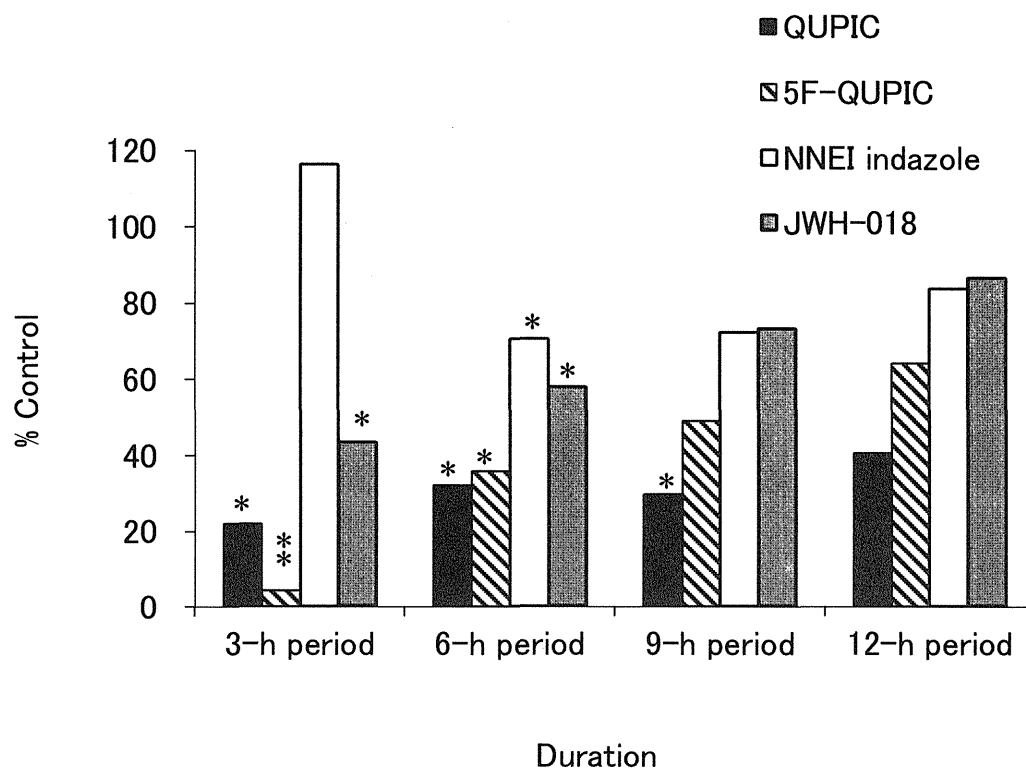


Fig. 3. Total amounts of locomotor activity during a 3-h, 6-h, 9-h and 12-h period after injections of QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC, NNEI indazole analog and JWH-018 at 5 mg/kg in rats. Each value is shown as percentage of the control value in animals treated with vehicle. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, significantly difference from the vehicle injection.

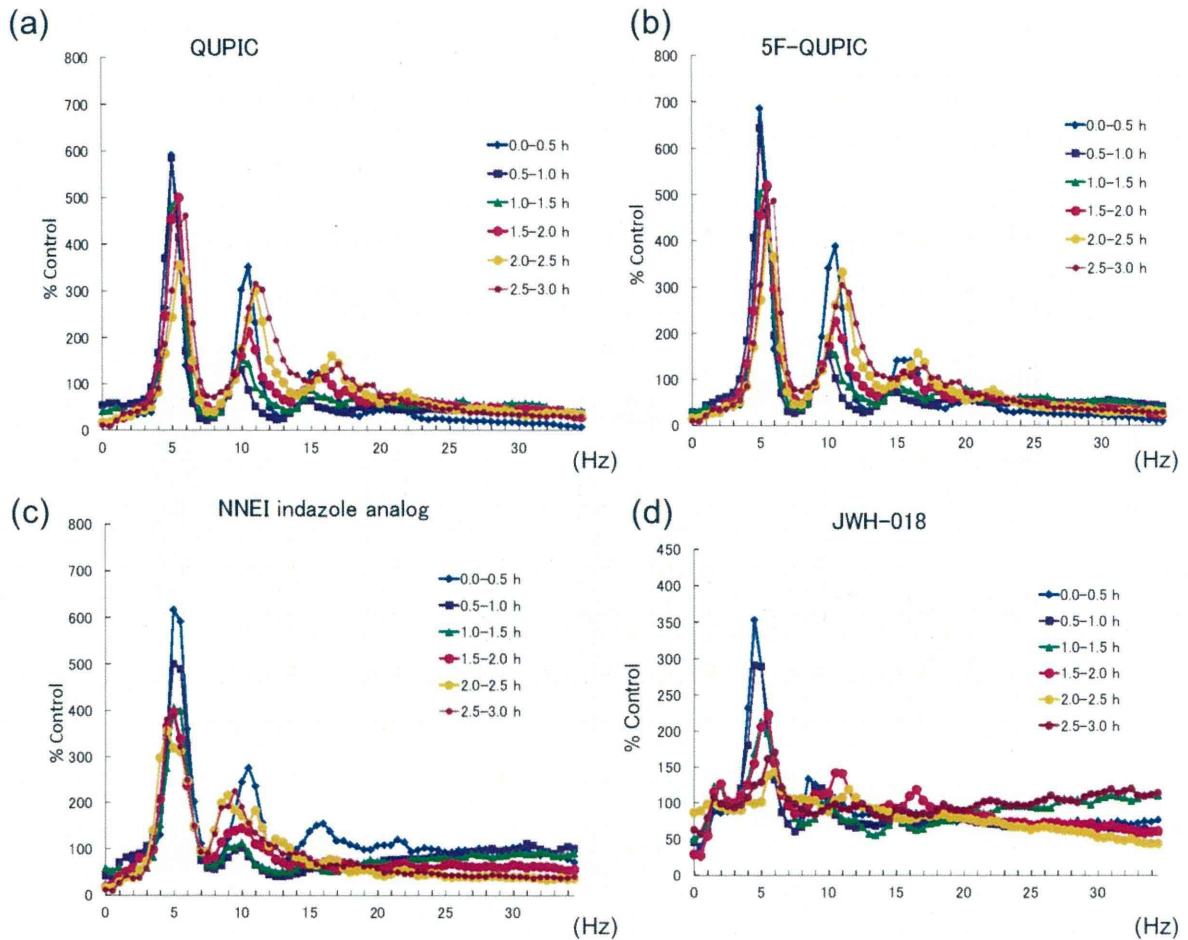


Fig. 4. Time course of changes in EEG power density after i.p. injection of QUPIC (a), 5-Fluoro-QUPIC (b), NNEI indazole analog (c) and JWH-018 (d) at 5 mg/kg during a 0.0 to 3.0 h period, respectively, in rats. Each value is shown as percentage of the control value in animals obtained with the vehicle treatment.

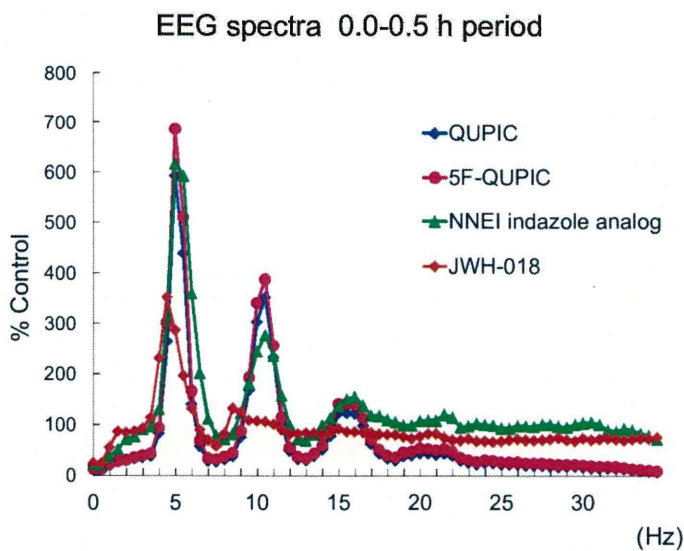


Fig. 5. EEG power density after i.p. injection of QUPIC, 5-Fluoro-QUPIC, NNEI indazole analog and JWH-018 a 0.0-0.5 h period in rats. Each value is shown as percentage of the control value in animals obtained with the vehicle treatment.

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 (公財)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

—新規流通合成カンナビノイドの自発運動量に及ぼす作用に関する研究—

研究要旨:最近の違法ドラッグ市場において、多くの製品中から合成カンナビノイドが検出されており、これら合成カンナビノイドが原因と考えられる健康被害が多数報告されている。しかし、これら合成カンナビノイドの薬理作用、特に行動に関する詳細についてはほとんど報告されていない。そこで本研究では、主に平成 24 年度から 25 年度にかけて国内(外)で流通した違法ドラッグ製品から新たに検出された合成カンナビノイドについてマウスの自発運動量に及ぼす作用を検討した。化合物の内訳としては、指定薬物(予定含む)14 化合物、未規制化合物 7 化合物の計 21 化合物を用い、陽性対照として麻薬(JWH-018)を用いた。その結果、NNEI, AM-2201 benzimidazole analog (FUBIMINA), MEPIRAPIM を除く 19 化合物はいずれもマウスの自発運動量を有意に減少させ、特に、JWH-018 indazole analog (THJ-018), QUPIC (PB-22), 5-Fluoro-NNEI indazole analog (5-Fluoro-MN-18), 5-Fluoro-AMB は、陽性対照である JWH-018 と同程度の行動量抑制作用を示した。また、化合物の構造分類から、おおよそ下記の順で自発運動量を減少させる傾向がみられた[カルボニル類, アミドエステル類 \geq エステル類 \geq ジアミド類 \geq アミド類, また、インダゾール骨格>インドール骨格(アミド類及びジアミド類の場合)]. 以上の結果から、これら新規流通合成カンナビノイドの摂取により重篤な健康被害が生じる可能性が危惧された。なお、本結果の一部は、平成 25 年度新規指定薬物として規制される際の参考データとして活用された。

研究協力者:

有竹浩介 筑波大学・国際統合睡眠医科学研究
機構 (IIS)・准教授

A. 研究目的

最近の違法ドラッグ市場において、多くの製品中から合成カンナビノイドが検出されており、これら合成カンナビノイドが原因と考えられる健康被害も多数報告されている。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(ラット)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 [1-8]。しかし、次々と新たな合成

カンナビノイドが検出される現状において、行動量解析のような、より簡便な薬理作用の評価法が必要である。ところが、これら化合物の薬理作用、特に行動に関する詳細については非常に報告が少ない。そこで本研究では、主に平成 24 年度から 25 年度にかけて国内(外)で流通した違法ドラッグ製品から新たに検出された合成カンナビノイドについて、マウスの自発運動量に及ぼす作用を調べた。化合物の内訳としては、指定薬物(予定含む)14 化合物、未規制化合物 7 化合物の計 21 化合物を用い(化合物 2-22, Fig. 1), 陽性対照として麻薬(JWH-018)を用いた(化合物 1, Fig. 1)。

B. 研究方法

【使用動物】C57BL/6系雄性マウス(生後9週, 体重21-24g)を日本エスエルシー株式会社より購入した。

【飼育方法】マウスは12時間ごとの明暗周期下で, 飼料と水を自由に摂取させた。

【薬物投与】使用した22化合物は, Cayman chemical 社製もしくは国立衛研において違法ドラッグ製品から単離精製したものをを用いた。各化合物は, DMSO/emurphor® EL-620(GAF Chemical, Wayne, NJ)/生理食塩水(1/1/18)の溶媒に溶解させ, マウスに各5 mg/kg ずつ腹腔内投与(intraperitoneal administration: i.p.)した。投与は19:00(明期開始時刻)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=3~4)。

【自発運動量測定】マウスは動物行動量測定用チャンバー内の個別のケージに入れ, 行動量測定を行った。行動量は, 動物から放出される赤外線を検出するセンサー(Biotex Japan社)とソフトウェアBiotex 16CH Act Monitor BAI2216(Biotex Japan社)を用いて48時間記録した。自発運動量は, 投与後1時間毎の累積量と, 投与0-6時間後及び6-12時間後の累積量を1日目のコントロールを100%として算出し, 対照群と比較した。

(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

今回検討を行った化合物を, その構造から以下の7種類に分類した(Fig. 1)。また, 各化合物の規制区分についてはFig. 1に示した。

1. カルボニル類(化合物 1-4)
2. エステル類(化合物 5-9)
3. アミド類(化合物 10-13)
4. ジアミド類(化合物 14-19)

5. アミドエステル類(化合物 20)

6. シクロプロピル類(化合物 21)

7. ピペラジン類(化合物 22)

【自発運動量の経時的変化】

各薬物をそれぞれ5 mg/kg ずつ投与した場合の, 投与後1時間毎の自発運動累積量の経時変化を, Fig. 2-4に示した。

カルボニル類(化合物 1-4)を投与した場合, 化合物 1-3は, それぞれ15, 13, 11時間後まで有意に自発運動量は減少させた(Fig. 2a-2c)。一方, ベンズイミダゾール骨格を有する化合物 4の投与後には有意差はみられなかった(Fig. 2d)。従って, カルボニル類のうち, インダゾール骨格(化合物 2, 3)は, 既報のインドール骨格(陽性対照: JWH-018, 1)と同様にマウスの行動抑制作用を有するが, ベンズイミダゾール骨格(化合物 4)は抑制作用を持たないことが示された。

次に, エステル類(化合物 5-9)を投与した場合, それぞれ11, 11, 4, 6, 11時間後まで有意に自発運動量は減少した(Fig. 2e-2i)。従って, これらエステル類は全てマウス行動抑制作用を有し, また, キノリノール骨格(化合物 5-8)及びナフタレン骨格(化合物 9)のいずれの化合物も抑制作用を有することが明らかとなった。

アミド類(化合物 10-13)を投与した場合, 化合物 11-13は, それぞれ2, 11, 12時間後まで有意に自発運動量を減少させた(Fig. 3b-3d)。一方, NNEI(化合物 4)では有意差がみられなかった(Fig. 3a)。従って, アミド類のうち, インダゾール骨格(化合物 12, 13)は, インドール骨格(化合物 11)と比較してより強力な行動抑制作用を有し, さらに, フルオロ体(化合物 11, 13)はメチル体(化合物 10, 12)と比較して若干強力な抑制作用を有することが示された。NNEI(化合物 4)には自発運動量に有意差はみられなかったが, 一部の化合物と同様に, 歩行失調や四肢の硬直及び不動状態が観察された(data not shown)。

次に, ジアミド類(化合物 14-19)を投与した場