

201427008A・B

平成 26 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政策研究事業)

違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性  
評価法の確立と乱用実態把握に関する研究

課題番号：H24-医薬-一般-008

平成 26 年度 総括・分担研究報告書  
平成 24-26 年度 総合研究報告書

平成 27 年 3 月

研究代表者：船田正彦

# 目次

平成 24～26 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政策研究事業) (課題番号: H24-医薬一般-008)

## 違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と乱用実態把握に関する研究

I. 平成 26 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 26 年度 分担研究報告書	
研究-1: 合成カンナビノイドの細胞毒性: 培養筋細胞による評価 船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	----- 11
研究-2: コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの 有害性予測法に関する研究 栗原正明 (国立医薬品食品衛生研究所)	----- 20
研究-3: 培養細胞を用いた覚せい剤類似化合物の新規検出システムの構築 富山健一 (放射線医学総合研究所緊急被ばく医療研究センター)	----- 25
研究-4: 合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価 浅沼幹人 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)	----- 33
研究-5: クラブイベント来場者における違法ドラッグの乱用実態把握に関する研究 嶋根卓也 (国立精神・神経医療研究センター)	----- 45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 52
IV. 平成 24～26 年度 総合研究報告書 [3 年間のまとめ] 船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	----- 54
V. 平成 24～26 年度 分担研究報告書 [3 年間のまとめ]	
研究-1: 危険ドラッグの包括指定に関する研究: 行動薬理学特性に基づく解析 船田正彦 (国立精神・神経医療研究センター)	----- 72
研究-2: コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの 有害性予測法に関する研究 栗原正明 (国立医薬品食品衛生研究所)	----- 78
研究-3: 危険ドラッグの細胞毒性評価法に関する研究 富山健一 (放射線医学総合研究所緊急被ばく医療研究センター)	----- 89
研究-4: 危険 (違法) ドラッグの神経細胞毒性評価と構造相関 浅沼幹人 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)	----- 94
研究-5: クラブイベント来場者における違法ドラッグの乱用実態把握に関する研究 嶋根卓也 (国立精神・神経医療研究センター)	----- 103
VI. 3 年間の研究成果の刊行に関する一覧表	----- 107



## 違法ドラッグの構造類似性に基づく有害性評価法の確立と 乱用実態把握に関する研究

研究代表者 船田正彦

(国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部 依存性薬物研究室長)

### 【研究要旨】

危険ドラッグ(平成 26 年 7 月より呼称が統一)の流通拡大は深刻である。危険ドラッグを含む製品としては、パウダー、リキッドおよびハーブの 3 タイプが主流であり、合成カンナビノイドやカチノン系化合物が検出されている。本研究では、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物を中心として、中枢作用を反映する行動薬理作用と細胞毒性の発現についてその作用発現メカニズムを解析した。本解析データを使用して、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物の化学構造から、中枢作用を推測するための評価系の構築を試みた。また、危険ドラッグの周知および乱用状況に関する調査を実施し、危険ドラッグ対策手法策定に関する考察を行った。

### 【研究-1：合成カンナビノイドの細胞毒性：培養筋細胞による評価】

本研究では、危険ドラッグによる筋細胞に対する毒性に関する検討の一環として、合成カンナビノイドのヒト筋細胞由来培養細胞に対する細胞毒性を検証した。ヒト胎児横紋筋肉腫細胞(RD 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を検討した。CP-55,940 添加 2 時間後、細胞毒性が発現した。この効果は、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。また、クレアチンキナーゼ活性の有意な増加が確認された。合成カンナビノイドはカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体を介して筋細胞へ直接作用して、細胞毒性を示すことが明らかになった。

### 【研究-2：コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの有害性予測法に関する研究】

構造活性相関(QSAR)によるカチノン系化合物の活性予測を行った。2 年度にカチノン系化合物における中枢作用の発現強度を、ドパミントランスポーター(DAT)活性値により推測する評価系を確立した。そこで、カチノン系化合物(図 1、図 2)において流通化合物等を考慮し、活性に重要な 3 つの置換基(R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>)を決め、そのバリエーションにより考えられる化合物について QSAR 法によって DAT の活性予測を行った。QSAR 式は活性既知化合物より求めた。

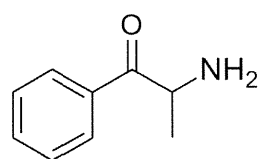


図 1：カチノン (Cathinone)

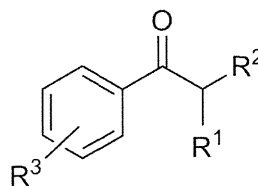


図 2：カチノン系化合物

### 【研究-3：培養細胞を用いた覚せい剤類似化合物の新規検出システムの構築】

カチノン系化合物の新規検出系の確立を目指し、薬物の作用点であるドパミントランスポーター(DAT)、ノルエピネフリントランスポーター(NET)そしてセロトニントランスポーター(SERT)を安定的に発現する細胞株の作製を試みた。DAT、NETそしてSERT遺伝子を挿入したベクターとViafectを用いてCHO細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DATおよびSERTタンパク質を発現する安定細胞株を得ることができた。本細胞を用いて各モノアミントランスポーター機能の確認を進めることで、より簡便で正確なスクリーニングシステム構築が可能になると考えられる。

### 【研究-4：合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価】

フェネチルアミン系、ピペラジン系、カチノン系危険ドラッグのドパミン系・セロトニン系神経毒性と構造との相関を包括的に検討した。覚醒剤AMP、METH構造類似体であるPCA、4FMP、PMMAは、いずれの細胞においてもAMP、METHと同程度の神経毒性を発現しており、4位の修飾によるそのモノアミン神経毒性への影響は少ないと考えられた。フェネチルアミン系危険ドラッグ「2Cシリーズ」は、2,5位にdimethoxy基を有する共通骨格によりドパミン系・セロトニン系神経細胞に対して、規制薬物のMDMA、メチロンやMETHよりもはるかに強い毒性を発揮した。さらに、4位の共通修飾構造がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられた。蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、危険(違法)ドラッグの曝露早期における神経細胞障害性を明らかにできることから、迅速かつ高感度の細胞障害性の評価法として有用であると考えられた。

### 【研究-5：クラブイベント来場者における違法ドラッグの乱用実態把握に関する研究】

危険ドラッグ対策の一つである指定薬物制度の周知状況等について、クラブイベント来場者を対象に調べた。調査協力が得られた関東地方の1店舗で開催された2回(平成27年1月)の音楽イベントの来場者(16歳以上)のうち46名に調査協力を依頼し、計26名(女性50%、平均44.7歳)に対してノート型パソコン(スタンドアロン型、オフライン)を用いた自記式調査を実施した(回収率:56.5%)。指定薬物制度に対する周知状況は、未周知群である「全く知らない」23.1%、「どちらかと言えば知らない」23.1%、および周知群である「どちらかと言えば知っている」42.3%、「詳しく知っている」15.4%に分類されたが、危険ドラッグ使用者はいずれも指定薬物制度を認知していなかった。指定薬物制度の未周知群は「危険ドラッグと名称を変更することで使用者は減る」と考える対象者が多いのに対して、周知群では「危険ドラッグに名称を変更しても使用者は変わらない」と考える対象者が多かった。

本研究では、カチノン系化合物に関する包括指定に係る対象範囲を検討した。包括指定の範囲は、実効性の高い範囲を指定するために、DATに関する文献値及びQSAR(定量的構造活性相関)法による予測値を用いて検討した。カチノン系化合物に関して、DATに対するQSAR解析により包括指定の範囲を決定できることが示唆された。また、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物において、筋培養細胞、DAT、SERT発現細胞およびモノアミン系培養神経細胞株と化学発光による細胞毒性評価、蛍光指示薬を用いての酸化ストレスの検出法は細胞障害性を迅速かつ感度良く、定量的に評価できる方法として有用であることが確認された。危険ドラッグに関する実態調査から、クラブ利用者層全体では「指定薬物制度による使用や所持の禁止」が概ね認知されているものの、危険ドラッグ使用者の間では十分に認知されていないことが示唆された。

本研究の危険ドラッグに対する作用強度を解析する評価システムは、危険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。危険ドラッグの乱用拡大は依然として深刻な状況であり、乱用防止のために規制の在り方を再考し一層の啓発が必要であろう。

分担研究者：船田正彦

国立精神・神経医療研究センター  
精神保健研究所薬物依存研究部  
依存性薬物研究室長

分担研究者：栗原正明

国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部 部長

分担研究者：富山健一

放射線医学総合研究所  
緊急被ばく医療研究センター  
博士研究員

分担研究者：浅沼幹人

岡山大学大学院医歯薬学  
総合研究科脳神経制御学講座  
神経ゲノム学 教授

分担研究者：嶋根卓也

国立精神・神経医療研究センター  
精神保健研究所薬物依存研究部  
心理社会研究室長

危険ドラッグの最大の問題点は、国内で流通する段階では「未規制化合物」である場合が多い点である。しかしながら、その作用は麻薬や覚せい剤と類似した効果を示すのである。現在までに国内で流通が確認された危険ドラッグとしては、トリプタミン誘導体である 5-MeO-DIPT やフェネチルアミン誘導体である「2C シリーズ、2CT-2、2CT-4、2CT-7」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。

危険ドラッグ製品含有の合成カンナビノイドとして 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)、(4-methyl-1-naphthalenyl) (1-pentyl-1H-indol-3-yl)-methanone (JWH-122)、[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多く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た。こうした状況を打破するために、平成 25 年 2 月より、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「包括規制」が導入された。

#### A. 研究目的

危険ドラッグ使用時の交通事故が多発し、その乱用が大きな社会問題となっている。平成 25 年 6 月に東京都池袋で、危険ドラッグ(いわゆる脱法ハーブ) 乱用が原因とされる交通事故が発生し死傷者がでており、危険ドラッグの蔓延が表面化した。この事故がきっかけになり、それまで汎用されていた「脱法ドラッグや合法ドラッグ」という呼称が「危険ドラッグ」に統一されるに至った。

一方、危険ドラッグの原末や液状の製品からは、覚せい剤と類似の効果を示すカチノン系化合物が検出される場合が多い。

カチノン系化合物もその種類は多いため、包括規制を実施する必要がある。カチノン系化合物はドパミントランスポーター(DAT)およびセロトニントランスポーター(SERT)を介して、様々な薬理作用を示す事が知られている。2年度にカチノン系化合物の中樞作用の強度は、DATに対する作用強度から推測できることを示した。

本研究では、カチノン系化合物の行動薬理作用発現における DAT の役割について検討した。量的構造活性相関(QSAR)解析による予測値と中樞興奮作用の発現強度の相関性を検討し、カチノン系化合物における包括規制範囲の拡大を念頭に妥当性について検証した。

一方、カチノン系化合物に加え、合成カンナビノイド、セロトニン系化合物といった危険ドラッグが数多く流通している。各系統の危険ドラッグに着目し、迅速に毒性発現等の有害作用を検出する評価システムの構築が重要である。現在までの研究から、培養細胞を利用する毒性評価は迅速かつ客観的な解析法として有用であると考えられる。本研究では、生体組織の培養細胞およびモノアミン系樹立安定株細胞を利用した毒性評価を行い、危険ドラッグによる細胞毒性評価のシステム構築並びに構図活性相関について検討した。

危険ドラッグの取締りにおいては、強化が進んでいる。厚生労働省では「未認可医薬品」、東京都では「知事指定薬」として規制されるケースもあり、乱用防止に貢献している。しかしながら、取締りの強化により、危険ドラッグの流通はアンダーグラウンド化していく傾向があり、その乱用の実態把握はきわめて重要になっている。危険ドラッグに関する乱用実態を把握することは、流通している薬物の情報が収集できるとともに、薬物乱用防止対策の立案、遂行の基礎資料として重要である。

本研究では、危険ドラッグとして流通拡大

が懸念されるカチノン系化合物の包括指定範囲の拡大を目指し、DAT および SERT に対する親和性と機能調節を指標に、QSAR（定量的構造活性相関）法による指定範囲の設定を行った。同様に、危険ドラッグの有害作用を明確にする目的で、培養細胞を利用した神経細胞毒性の発現を評価し、その発現メカニズムに関する基盤研究を行なった。また、危険ドラッグの研究および評価の際の基礎資料を提供する目的で、クラブユーザーを対象に、危険ドラッグを含む薬物乱用実態に関する疫学調査を実施した。

## B. 各研究の目的、方法、結果

[研究-1：合成カンナビノイドの細胞毒性：培養筋細胞による評価]

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

危険ドラッグの乱用が大きな社会問題となっている。危険ドラッグ乱用により重篤な健康被害が発生している。意識障害や幻覚などの精神症状に加え、生体組織への直接的な有害作用は深刻である。なかでも横紋筋融解症の発症は死に至る可能性が極めて高く、生命の危機的状況である。本研究では、危険ドラッグによる筋細胞に対する毒性に関する検討の一環として、合成カンナビノイドのヒト筋細胞由来培養細胞に対する細胞毒性を検証した。1) 合成カンナビノイドの細胞毒性：ヒト胎児横紋筋肉腫細胞(RD 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を検討した。死細胞由来プロテアーゼ量を化学発光で測定した。(-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxy-propyl)-cyclohexanol (CP-55,940)添加2時間後、細胞毒性が発現した。この効果は、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。2) 細胞

内  $\text{Ca}^{2+}$ の変動：RD 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 添加の2時間後、蛍光強度の増加が確認された。この効果は、カンナビノイド  $\text{CB}_1$  受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。3) クレアチンキナーゼ (CK)活性：RD 細胞を利用して、薬物添加による NADH 遊離量の変化を、発色指示薬を使用して測定した。CP-55,940 添加2時間後、細胞培養液を回収し NADH 遊離量を測定したところ有意な増加が確認された。

[研究-2: コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの有害性予測法に関する研究]

栗原正明  
国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部 部長

カチノン系化合物に関する包括指定の対象範囲の妥当性を検討した。包括指定の範囲としては、実効性の高い範囲を指定するために、文献値及び QSAR (定量的構造活性相関) 法による予測値を効果的に用いることでその範囲を検討した。DAT に対する親和性強度に関する解析により、包括指定の範囲の拡大が可能であると考えられる。

[研究-3: 培養細胞を用いた覚せい剤類似化合物の新規検出システムの構築]

富山健一  
放射線医学総合研究所  
緊急被ばく医療研究センター  
博士研究員

カチノン系化合物は中枢興奮作用を有しており、その薬理機序は脳内神経伝達物質のドパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニンの遊離促進および再取り込みの阻害であると考えられる。本研究では、カチノン系化合物の作用点であるドパミントランスポーター

(DAT)、ノルエピネフリントランスポーター (NET)そしてセロトニントランスポーター (SERT)を安定的に発現する細胞株を作成し、生物学的応答をもとに薬理効果から薬物の種類を推測可能なスクリーニングシステム構築を試みた。マルチクローニングサイトに DAT、NETそして SERT 遺伝子を挿入したベクター CMV6-Entry と Viasfect を用いて CHO 細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DAT および SERT タンパク質を発現する安定細胞株を得ることができた。

[研究-4: 合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価]

浅沼幹人  
岡山大学大学院医歯薬学  
総合研究科脳神経制御学講座  
ゲノム学 教授

フェネチルアミン系危険 (違法) ドラッグ (PCA, 4FMP, PMMA, 「2C シリーズ」の 2CT-7, 2CT-4, 2CT-2, 2C-I, 2C-C, T-2C-H)、ピペラジン系危険 (違法) ドラッグ (PP, 2CPP, 4CPP, 4MPP)、カチノン系危険 (違法) ドラッグ (ethcathinone, 2-FCAT, 3-FCAT, 4-FCAT) のドパミン系・セロトニン系神経毒性と構造との相関を包括的に検討した。覚醒剤 AMP, METH 構造類似体である PCA, 4FMP, PMMA は、いずれの細胞においても AMP, METH と同程度の神経毒性を発現しており、4 位の修飾によるそのモノアミン神経毒性への影響は少ないと考えられた。フェネチルアミン系危険 (違法) ドラッグ 「2C シリーズ」は、2,5 位に dimethoxy 基を有する共通骨格によりドパミン系・セロトニン系神経細胞に対して、規制薬物の MDMA、メチロンや METH よりもはるかに強い毒性を発揮する。さらに、4 位の共通修飾構造がセロトニン系神経細胞に対して極めて強い酸化ストレス・細胞毒性をもたらす危険性があると考えられた。

[研究-5: クラブイベント来場者における違法

## ドラッグの乱用実態把握に関する研究]

嶋根卓也

国立精神・神経医療研究センター

精神保健研究所薬物依存研究部

心理社会研究室長

危険ドラッグ乱用者による犯罪や、重大な交通事故を引き起こす事案が後を絶たず、深刻な社会問題となっている背景を踏まえ、本研究では、危険ドラッグ対策の一つである指定薬物制度の周知状況等について、クラブイベント来場者を対象に調べた。調査協力が得られた関東地方の1店舗で開催された2回（平成27年1月）の音楽イベントの来場者（16歳以上）のうち46名に調査協力を依頼し、計26名（女性50%、平均44.7歳）に対してノート型パソコン（スタンドアロン型、オフライン）を用いた自記式調査を実施した（回収率：56.5%）。

指定薬物制度に対する周知状況は、未周知群である「全く知らない」23.1%、「どちらかと言えば知らない」23.1%、および周知群である「どちらかと言えば知っている」42.3%、「詳しく知っている」15.4%に分類されたが、危険ドラッグ使用者はいずれも指定薬物制度を認知していなかった。指定薬物制度の未周知群は「危険ドラッグと名称を変更することで使用者は減る」と考える対象者が多いのに対して、周知群では「危険ドラッグに名称を変更しても使用者は変わらない」と考える対象者が多かった。

### C. 考察

#### 1. 合成カンナビノイドの細胞毒性：培養筋細胞による評価

危険ドラッグとして流通している合成カンナビノイドの筋培養細胞に対する細胞毒性を評価した。合成カンナビノイドはCB<sub>1</sub>受容体-細胞内筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>遊離を介して、筋細胞に対する直接的な毒性を示すことが示された。RD細胞は、合成カンナビノイドによ

り細胞毒性が発現し、同時にCK活性が増加することから、危険ドラッグによって発現する横紋筋融解症の評価モデルとして利用可能であると考えられる。RD細胞による評価方法は、筋細胞に対する危険性予測のための迅速かつ高感度の検出法として有用である。本研究結果から、合成カンナビノイド乱用は精神作用を示し、さらに生体組織への直接作用を示すことから、極めて毒性の高い薬物であることが判明した。

#### 2. コンピュータシミュレーションによる違法ドラッグの有害性予測法に関する研究

カチノン系化合物に関する包括指定の対象範囲の妥当性を検討した。包括指定の範囲としては、実効性の高い範囲を指定するために、文献値及びQSAR（定量的構造活性相関）法による予測値を効果的に用いることでその範囲を検討した。DATに対する親和性強度に関する解析より、包括指定の範囲の拡大が可能であることが示唆された。本研究から、包括指定の範囲を検討する上で、ターゲットになる受容体に対する親和性や細胞内情報伝達機構の調整強度などの文献値及びQSAR（定量的構造活性相関）法による予測値を効果的に用いることでその範囲を推定することが可能であると考えられる。

#### 3. 培養細胞を用いた覚せい剤類似化合物の新規検出システムの構築

カチノン系化合物の作用点であるモノアミントランスポーターを安定発現する培養細胞株の樹立を試みた。本研究では、クローニングサイトにSLC6A3 (DAT)、ELK3 (NET)およびSLC6A4 (SERT)の遺伝子を導入したベクターCMV6-EntryとViafectを用いてCHO細胞にトランスフェクションを行った。その結果、DATおよびSERTを安定発現する細胞株を得ることができた。今後は、各トランスポーターの機能評価を行うために、トリチウムラベルをしたドパミン、ノルエピネフリンそしてセロトニンを用いて再取り込み阻害作用を検



討し、トランスポーターの働きを確認する。その後機能が正常に働く細胞株の中からより均一な細胞集団を得るためのクローニングを行う予定である。

#### 4. 合成危険ドラッグの神経細胞毒性-構造相関の評価

最近乱用が問題視されている fluoro 基を有するカチノン系危険（違法）ドラッグも含め広義のフェネチルアミン系危険（違法）ドラッグが有するカテコールアミンに類似した骨格が少なくともドパミン系神経細胞に対する強い親和性をもたらすと考えられた。また、カチノン骨格はあまり強い神経毒性を呈さないが、カチノン類のベンゼン環の fluoro 基による修飾はさらにそのドパミン神経細胞毒性を低下させると考えられた。さらに、蛍光指示薬による活性酸素種生成の検出法は、形態変化がほとんどみられない比較的低濃度の危険（違法）ドラッグの曝露早期における神経細胞障害性を明らかにできることから、迅速かつ感度良く、しかも軽微な細胞障害性を評価できる方法として有用であると考えられた。

#### 5. クラブイベント来場者における違法ドラッグの乱用実態把握に関する研究

クラブ利用者層全体では「指定薬物制度による使用や所持の禁止」が概ね認知されているものの、危険ドラッグ使用者の間では十分に認知されていないことが示唆された。つまり、これらの使用者は制度を正しく理解せずに危険ドラッグを使用した可能性が考えられる。「制度を正しく理解していない使用者」に対しては、「使用や所持の禁止」を正しく理解させることで、危険ドラッグの使用を減らしていくことが可能かもしれない。また、周知群は制度を正しく理解しているからこそ、名称変更だけで使用者を減らすことは困難であり、販売店やインターネットでの販売を規制するといった供給側に対する規制や、使用や所持を禁止するといった需要側に対する規制を強化していかなければ、本質的な問題解決

とはならないと考えているのかも知れない。

#### D. 結論

本研究では、カチノン系化合物に関する包括指定に係る対象範囲を検討した。包括指定の範囲は、実効性の高い範囲を指定するために、DAT に関する文献値及び QSAR（定量的構造活性相関）法による予測値を用いて検討した。カチノン系化合物に関して、DAT に対する QSAR 解析により包括指定の範囲を決定できることが示唆された。また、合成カンナビノイドおよびカチノン系化合物において、筋培養細胞、DAT、SERT 発現細胞およびモノアミン系培養神経細胞株と化学発光による細胞毒性評価、蛍光指示薬を用いての酸化ストレスの検出法は細胞障害性を迅速かつ感度良く、定量的に評価できる方法として有用であることが確認された。危険ドラッグに関する実態調査から、クラブ利用者層全体では「指定薬物制度による使用や所持の禁止」が概ね認知されているものの、危険ドラッグ使用者の間では十分に認知されていないことが示唆された。

本研究の危険ドラッグに対する作用強度を解析する評価システムは、危険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。危険ドラッグの乱用拡大は依然として深刻な状況であり、乱用防止のために規制の在り方を再考し一層の啓発が必要であろう。

#### E. 健康危険情報

本研究は、危険ドラッグの中枢作用、毒性および乱用実態把握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) Funada M., Mori T, Maeda J, Tsuda Y, Komiya S, Shimizu N, Kamei J, Suzuki T., Splenectomy modifies hyperactive states of the dopaminergic system induced by morphine in C57BL/6J-bgJ/bgJ (beige-J) mice. *Eur J Pharmacol.* 742C:89-93, (2014).
- 2) Mori T, Funada M., Tsuda Y, Maeda J, Uchida M, Suzuki T., Dopaminergic hyperactivity accompanied by hyperlocomotion in C57BL/6J-bg(J)/bg(J) (beige-J) mice. *J Pharmacol Sci.* 125(2):233-236, (2014).
- 3) Yamashita, H., Demizu, Y., Shoda, T., Sato, Y., Oba, M., Tanaka, M., Kurihara, M.: Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2403–2408(2014)
- 4) Nagakubo, T., Demizu, Y., Kanda, Y., Misawa, T., Shoda, T., Okuhira, K., Sekino, Y., Naito, M., Kurihara, M.: Peptides as Inhibitors of Estrogen Receptor-Mediated Transcription. *Bioconjugate Chem.*, 2014, 25, 1921–1924
- 5) . Shoda, K. Okuhira, M. Kato, Y. Demizu, H. Inoue, M. Naito, M. Kurihara: Design and synthesis of tamoxifen derivatives as a selective estrogen receptor down-regulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 87-89 (2014)
- 6) . Misawa, Y. Demizu, M. Kawamura, N. Yamagata, M. Kurihara: Structural development of stapled short helical peptides as vitamin D receptor (VDR)-coactivator interaction inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 1055–1061
- 7) Tachibana, H., Ogawa, D., Sogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I., Terami, N., Hatanaka, T., Horiguchi, C.S., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Wada, J., Yamada, H., Takei, K. and Makino, H.: Metallothionein deficiency exacerbates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.*, 306(1):F105-115, 2014.
- 8) Onoue, Y., Kuwatsuka, K., Miyazaki, I., Asanuma, M., Kitamura, Y. and Sendo, T.: Effects of bupropion and pramipexole on cell proliferation in the hippocampus of adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 37: 327-330, 2014.
- 9) Miyake, A., Kitamura, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Sendo, T.: Effects of (+)-8-OH-DPAT on the duration of immobility during the forced swim test and hippocampal cell proliferation in ACTH-treated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 122: 240-245, 2014.
- 10) Miyoshi, K., Kasahara, K., Murakami, S., Takeshima, M., Kumamoto, N., Sato, A., Miyazaki, I., Matsuzaki, S., Sasaoka, T., Katayama, T. and Asanuma, M.: Lack of dopaminergic inputs elongates the primary cilia of striatal neurons. *PLoS ONE*, 9(5): e97918, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0097918.
- 11) Murakami, S., Miyazaki, I., Sogawa, N., Miyoshi, K. and Asanuma, M.: Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. *Neurotox. Res.*, 26: 285-98, 2014. doi: 10.1007/s12640-014-9480-1
- 12) Kasahara, K., Miyoshi, K., Murakami, S., Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker Arl13b. *Acta Med. Okayama*, 68: 317-322, 2014.
- 13) Ohmori, I., Kawakami, N., Liu, S., Wang, H., Miyazaki, I., Asanuma, M., Michiue, H., Matsui, H., Mashimo, T. and Ouchida, M.: Methylphenidate improves learning impairments and hyperthermia-induced

- seizures caused by a Scn1a mutation. *Epilepsia*, 55(10): 1558-1567, 2014. doi: 10.1111/epi.12750
- 14) Asanuma, M., Miyazaki, I., Murakami, S., Diaz-Corrales, F.J. and Ogawa, N.: Striatal astrocytes act as a reservoir for L-DOPA. *PLoS ONE*, 9(9): e106362, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0106362.
  - 15) Asano, T., Koike, M., Sakata, S., Takeda, Y., Nakagawa, T., Hatano, T., Ohashi, S., Funayama, M., Yoshimi, K., Asanuma, M., Toyokuni, S., Mochizuki, H., Uchiyama, Y., Hattori, N. and Iwai, K.: Possible involvement of iron-induced oxidative insults in neurodegeneration. *Neurosci. Lett.*, 588: 29-35, 2015.
  - 16) 嶋根卓也：変わる薬物依存・変わる支援～危険ドラッグから処方薬乱用まで～. 季刊リカバリーアイランド沖縄, Vol.007, p6-7, 2015.
  - 17) 和田清, 松本俊彦, 船田正彦, 嶋根卓也, 邱冬梅: 薬物乱用・依存の疫学. *精神科*, 26 (1) 44-49, 2015.
  - 18) 嶋根卓也：社会問題化する危険ドラッグに薬剤師はどのように関われるか. *日本薬剤師会雑誌* 2014, 66 (11) : 17 - 20, 2014.
  - 19) 嶋根卓也：青少年はなぜ薬物に手を出すのか. *教育と医学* 738 : 58-67, 2014.
2. 学会発表
- 1) 船田正彦：「脱法ドラッグ」の依存性・細胞毒性評価と対応策としての「包括指定」. 第 110 回日本精神神経学会. 横浜. 6 月 27 日. 2014.
  - 2) 船田正彦：脱法ハーブの危険性を知る：薬物依存性・細胞毒性ならびにその法規制. 第 14 回日本外来精神医療学会. 宇都宮. 7 月 12 日. 2014.
  - 3) 船田正彦：脱法ドラッグによる有害作用の評価：合成カンナビノイドの包括的規制を目指して. 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 第 49 回日本アルコール薬物・医学会総会. 横浜. 10 月 3 日. 2014.
  - 4) 竹林美佳, 富山健一, 和田 清, 船田正彦： 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) の行動薬理学的特性と有害作用. 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 第 49 回日本アルコール薬物・医学会総会. 横浜. 10 月 4 日. 2014.
  - 5) Funada, M.: Abuse of law-evading herbs as a new trend in Japan: harmful effect and legislation. The 3rd Congress of Asia-Pacific Society for Alcohol and Addiction Research. Shanghai, April 26, 2014.
  - 6) 宮崎育子, 村上真樹, 鳥越菜央, 北村佳久, 浅沼幹人：パーキンソン病モデルマウスにおけるレベチラセタムによる神経保護効果. 第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014.3.19.
  - 7) 宮崎育子, 村上真樹, 浅沼幹人: パーキンソン病モデルマウスにおけるレベチラセタムの神経保護とアストロサイトの関与. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.24.
  - 8) 宮崎育子, 村上真樹, 鳥越菜央, 北村佳久, 浅沼幹人：アストロサイトを介したレベチラセタムのドパミン神経保護効果に関する検討. 第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.6.20.
  - 9) 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人：ロテノン皮下投与による中枢・末梢神経系における経時的組織学的変化. 第 125 回日本薬理学会近畿部会, 岡山, 2014.6.20.
  - 10) 村上真樹, 宮崎育子, 十川紀夫, 浅沼幹人：農薬ロテノン誘発パーキンソン病モデルマウスにおける中枢および腸管神経障害とメタロチオネインによる神経保護. 第 21 回創薬・薬理フォーラム, 岡山, 2014.7.26.
  - 11) 村上真樹, 宮崎育子, 十川紀夫, 浅沼幹人：ロテノン誘発パーキンソン病モデルマウスの中枢および腸管神経系にお

- るメタロチオネインの変化.第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会, 京都, 2014.9.4.
- 12) 三好 耕, 笠原恭輔, 宮崎育子, 松崎伸介, 黒田啓介, 貝淵弘三, 浅沼幹人, 片山泰一: Disc1 遺伝子 exon 6 に欠損を持つマウスを用いた Disc1 の解析. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014.9.12.
- 13) 宮崎育子, 村上真樹, 浅沼幹人: アストロサイトは L-DOPA のリザーバーとなりうる. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014.9.13.
- 14) 中野剛志, 鳥越菜央, 村上真樹, 宮崎育子, 浅沼幹人, 北村佳久, 千堂 年昭: ALS モデルマウスにおけるセロトニン 1A アゴニストによる神経保護効果の検討. 第 36 回日本生物学的精神医学会, 第 57 回日本神経化学会大会合同年会, 奈良, 2014.9.29.
- 15) 宮崎育子, 村上真樹, 浅沼幹人: パーキンソン病モデルにおけるアストロサイトでの L-DOPA 取り込み. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋, 2014.11.22.
- 16) 三好 耕, 松崎伸介, 宮崎育子, 浅沼幹人, 片山泰一: ドパミン欠乏による線条体ニューロンの 1 次繊毛の伸長. 第 41 回日本脳科学会, 福井, 2014.11.22. 嶋根卓也: 繁華街の若者における脱法ドラッグの乱用状況: クラブユーザー調査より. シンポジウム 3 脱法ドラッグの蔓延とその危険性: 検出からその規制まで, 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 神奈川, 2014.10.3 - 4.
- 17) 嶋根卓也, 和田 清, 日高庸晴, 船田正彦: クラブ利用者層における脱法ドラッグ乱用の実態と乱用に伴う身体・精神症状について. シンポジウム 52「脱法ドラッグ」乱用・依存の実態と対応策について, 第 110 回日本精神神経学会学術総会,

神奈川, 2014.6.27.

- 18) 嶋根卓也, 和田 清, 日高庸晴, 船田正彦: クラブイベント来場者における形状別にみた脱法ドラッグの使用パターンと使用に伴う主観的症状について. 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所平成 25 年度研究報告会(第 25 回). 国立精神・神経医療研究センター, 東京, 2014.3.10.

#### 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

分担研究報告書

合成カンナビノイドの細胞毒性：培養筋細胞による評価

分担研究者：船田正彦（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所 薬物依存研究部）

【研究要旨】

危険ドラッグの乱用が大きな社会問題となっている。危険ドラッグ乱用により重篤な健康被害が発生している。意識障害や幻覚などの精神症状に加え、生体組織への直接的な有害作用は深刻である。なかでも横紋筋融解症の発症は死に至る可能性が極めて高く、生命の危機的状況である。本研究では、危険ドラッグによる筋細胞に対する毒性に関する検討の一環として、合成カンナビノイドのヒト筋細胞由来培養細胞に対する細胞毒性を検証した。1) 合成カンナビノイドの細胞毒性：ヒト胎児横紋筋肉腫細胞(RD 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を検討した。死細胞由来プロテアーゼ量を化学発光で測定した。(-)-cis-3-[2-hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxy-propyl)-cyclohexanol (CP-55,940)添加 2 時間後、細胞毒性が発現した。この効果は、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。2) 細胞内 Ca<sup>2+</sup>の変動：RD 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 添加の 2 時間後、蛍光強度の増加が確認された。この効果は、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された。3) クレアチンキナーゼ(CK)活性：RD 細胞を利用して、薬物添加による NADH 遊離量の変化を、発色指示薬を使用して測定した。CP-55,940 添加 2 時間後、細胞培養液を回収し NADH 遊離量を測定したところ有意な増加が確認された。

以上の評価結果から、合成カンナビノイドはカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体を介して筋細胞へ直接作用して、細胞毒性を示すことが明らかになった。この毒性の発現には細胞内 Ca<sup>2+</sup>の増加が関与していると考えられる。RD 細胞は、合成カンナビノイドにより細胞毒性が発現し、同時に CK 活性が増加することから、危険ドラッグによって発現する横紋筋融解症の評価モデルとして利用可能であると考えられる。RD 細胞による評価方法は、筋細胞に対する危険性予測のための迅速かつ高感度の検出法として有用である

本研究結果から、合成カンナビノイド乱用は精神作用を示し、さらに生体組織への直接作用を示すことから、極めて毒性の高い薬物であることが判明した。

A. 研究目的

わが国では、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<sup>1-3)</sup>。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た。いわゆる脱法ハーブには、大麻と類似の効果を示す



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<sup>4)</sup>。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-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<sup>4)</sup>。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。

わが国において、2014年6月に東京池袋で複数の犠牲者がでた重大な交通事故が発生した。これを契機に、「違法ドラッグ(いわゆる脱法ドラッグ)」とされていた呼称が「危険ドラッグ」に統一され、同時にその規制および取り締まりが強化された。一方、製品に含まれ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 $\Delta^9$ -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CB<sub>1</sub>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<sup>5)</sup>。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、CB<sub>1</sub>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。

当研究室では、Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞にCB<sub>1</sub>受容体およびG<sub>α16</sub>をトランスフェクションし、CB<sub>1</sub>受容体およびG<sub>α16</sub>発現安定細胞株 CHO-hCB<sub>1</sub>-hG<sub>α16</sub>細胞を確立し

た。本細胞は、危険ドラッグに合成カンナビノイド、CB<sub>1</sub>受容体作用薬が含まれている場合、蛍光指示薬などを利用することで高感度の検出が可能であり、細胞を利用した評価系の有用性が確認されている。

一方、危険ドラッグ乱用によって横紋筋融解症の発症が報告されており<sup>6)</sup>、生体の筋細胞に対して直接的に有害作用を示すことが明らかになっている。薬物自体の検出に加え、有害作用検出のために培養細胞を利用した評価法を確立することは重要である。

本研究では、ヒト胎児横紋筋肉腫細胞(RD細胞)を利用して、合成カンナビノイドの細胞毒性の評価を行い、培養細胞による生体組織に対する有害作用評価システムの妥当性を検証した。

## B. 研究方法

細胞：ヒト胎児横紋筋肉腫細胞(RD細胞)はJCRB細胞バンクより入手し、使用した。培養メディアウムは、DMEM+FBS(10%)とした。

使用薬物：合成カンナビノイドとしてはCP-55,940(Cayman Chem.)、JWH133 (Tocris Bioscience)、カンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体拮抗薬としてはN-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carbox-amide (AM251, Tocris Bioscience)を使用した。

### 1. 合成カンナビノイドの細胞毒性

RD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 $1 \times 10^4$ cells/wellとなるように播種し、37°C・5.0%CO<sub>2</sub>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。化学発

光は、プレートリーダー(TECAN, infinite F200)を使用して測定した。

## 2. カンナビノイド CB 受容体作用の解析

RD 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  $1 \times 10^4$  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 (Molecular Devices, USA) により測定した。

## 3. クレアチンキナーゼ活性

RD 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  $1 \times 10^4$  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、薬物添加後のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)量の測定を Creatine Kinase Activity Assay Kit (Abcam)のプロトコールに従って行った。吸光度(波長 450nm)は、プレートリーダー(TECAN, infinite F200)を使用して測定した。

## C. 研究結果

### 1. 合成カンナビノイドの細胞毒性

RD 細胞を使用し、合成カンナビノイドの細胞毒性について検討した。合成カンナビノイドである CP-55,940 の添加により、死細胞由来プロテアーゼ活性の有意な増加が確認された。CP-55,940 の添加により、濃度依存的に細胞毒性の発現が確認された(Fig. 1)。また、この効果は、 $\text{CB}_1$  受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された(Fig. 2A)。さらに、細胞内筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を抑制するリアノジン受容体拮抗薬 dantrolene の併用により、有意に抑制された(Fig. 2B)。一方、 $\text{CB}_2$  受容体作用薬である JWH133 では有意な影響は認められなかった。

### 2. カンナビノイド CB 受容体作用の解析

RD 細胞を使用し、合成カンナビノイドのカルシウム動態に対する影響を検討した。CP-55,940 の添加により、蛍光強度が増大した。この効果は、 $\text{CB}_1$  受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制された(Fig. 3)。一方、 $\text{CB}_2$  受容体作用薬である JWH133 では有意な影響は認められなかった。

### 3. クレアチンキナーゼ活性

RD 細胞を使用し、合成カンナビノイドのクレアチンキナーゼ活性に対する影響について検討した。CP-55,940 の添加により、クレアチンキナーゼ活性の有意な増加が確認された (Fig. 4)。

## D. 考察

危険ドラッグとして流通している合成カンナビノイドの筋培養細胞に対する細胞毒性を評価した。合成カンナビノイドの CP-55,940 の添加により、細胞毒性が誘発された。この効果は、 $\text{CB}_1$  受容体拮抗薬 AM251 の前処置により完全に抑制されることから、 $\text{CB}_1$  受容体を介した作用であることが明らかになった。合成カンナビノイドは  $\text{CB}_1$  受容体を介して、筋細胞に対する直接的な毒性を示すことが示された。

一方、合成カンナビノイドによる細胞毒性の発現は、細胞内筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を抑制する dantrolene の併用により、有意に抑制された。また、合成カンナビノイドによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を検証したところ、有意な  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の増加が確認された。したがって、合成カンナビノイドによる細胞毒性の発現には、筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離増加が関与するものと考えられる。

本研究では、横紋筋由来の RD 細胞において、合成カンナビノイドにより細胞毒性が発現することを見出した。細胞毒性発現時のクレアチンキナーゼ (CK) 活性を測定したところ、有意な上昇が確認された。クレアチンキナーゼ (CK) は、クレアチンホスホキナーゼ

(CPK)とも呼ばれる酵素である。CK はクレアチンと ATP の触媒に関係しており、クレアチンはホスホクレアチンに、ATP は ADP へと可逆的な変換を引き起こす。CK は様々な組織や細胞に存在しており、特に筋肉や心臓、脳で高く発現している。代表的な CK としては、muscle(M)と brain(B)の2つのサブユニットが知られており、3 種類のアイソザイム(CK-MM, CK-MB, CK-BB)を構成するとされる<sup>7)</sup>。CK 値の上昇は、急性心筋梗塞や筋ジストロフィー、肺梗塞、脳腫瘍などの多くの疾患と関連するとされる。同様に、横紋筋融解症の発症時にも高い CK 値を示すことが知られている<sup>8)</sup>。横紋筋融解症は、横紋筋細胞が融解し筋細胞内の成分が血中に流出する症状を示す。重症の場合は、多量のアミノ酸によって腎臓の尿細管細胞を傷害されて急性腎不全症状(乏尿、浮腫、呼吸困難、高K血症、アシドーシス等)を伴い、臓器機能不全を発症し、死に至る場合もある。血液生化学検査においては、血中アミノ酸が上昇し、クレアチンキナーゼ(CK)などの筋原酵素も著しく上昇する。したがって、本研究で使用した横紋筋由来の RD 細胞モデルは、薬物による横紋筋融解症の発症メカニズムの解明に利用できると考えられる。

本研究では、培養横紋筋モデルで合成カンナビノイドによって、細胞毒性が発現し、同時に CK 活性が上昇していることから、横紋筋融解症を反映するモデルとして利用できる可能性が示唆された。

本研究結果から、RD 細胞による評価方法は、筋細胞に対する危険性予測のための迅速かつ高感度の検出法として有用である。また、合成カンナビノイド乱用は精神作用を示し、さらに生体組織への直接作用を示すことから、極めて毒性の高い薬物であることが判明した。

#### E. 結論

危険ドラッグとして流通している合成カンナビノイドの筋培養細胞に対する細胞毒性を

評価した。合成カンナビノイドは CB<sub>1</sub> 受容体-細胞内筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離を介して、筋細胞に対する直接的な毒性を示すことが示された。

培養細胞による毒性評価は、迅速な評価が可能であることから、薬物規制のための化学的データとして有用である。筋培養細胞の利用により、横紋筋融解症の発症リスクの推測も可能となり、危険化合物の迅速な発見に活用できると考えられる。また、将来的に乱用拡大につながる化学物質を特定し規制薬物指定への早期の対策に有用であると考えられる

#### 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) Durand D, Delgado LL, Parra-Pellot DM, Nichols-Vinueza D.: Psychosis and severe rhabdomyolysis associated with synthetic cannabinoid use. Clin Schizophr Relat Psychoses.;8(4): 205-208. doi: 10.3371/CSRP.DUDE.031513. 2015.
- 7) Lang H, Würzburg U.: Creatine kinase, an enzyme of many forms. Clin Chem. 1982 28(7):1439-1447. 1982.
- 8) Bosch X, Poch E, Grau JM.: "Rhabdomyolysis and acute kidney injury." N Engl J Med. 361: 62-72. 2009.
- 3) 船田正彦: 脱法ドラッグによる有害作用の評価: 合成カンナビノイドの包括的規制を目指して. 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 第 49 回日本アルコール薬物・医学会総会. 横浜. 10 月 3 日. 2014.
- 4) 竹林美佳、富山健一、和田 清、船田正彦: 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) の行動薬理学的特性と有害作用. 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 第 49 回日本アルコール薬物・医学会総会. 横浜. 10 月 4 日. 2014.
- 5) Funada, M.: Abuse of law-evading herbs as a new trend in Japan: harmful effect and legislation. The 3rd Congress of Asia-Pacific Society for Alcohol and Addiction Research. Shanghai, April 26, 2014.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Funada M, Mori T, Maeda J, Tsuda Y, Komiya S, Shimizu N, Kamei J, Suzuki T., Splenectomy modifies hyperactive states of the dopaminergic system induced by morphine in C57BL/6J-bgJ/bgJ (beige-J) mice. Eur J Pharmacol. 742C:89-93, (2014).
- 2) Mori T, Funada M, Tsuda Y, Maeda J, Uchida M, Suzuki T., Dopaminergic hyperactivity accompanied by hyperlocomotion in C57BL/6J-bg(J)/bg(J) (beige-J) mice. J Pharmacol Sci. 125(2):233-236, (2014).

### 2. 学会発表

- 1) 船田正彦: 「脱法ドラッグ」の依存性・細胞毒性評価と対応策としての「包括指定」. 第 110 回日本精神神経学会. 横浜. 6 月 27 日. 2014.
- 2) 船田正彦: 脱法ハーブの危険性を知る: 薬物依存性・細胞毒性ならびにその法規制. 第 14 回日本外来精神医療学会. 宇都

宮. 7 月 12 日. 2014.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他  
特になし。

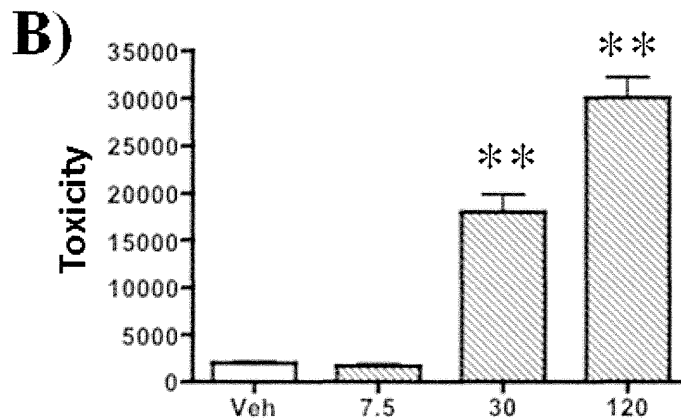
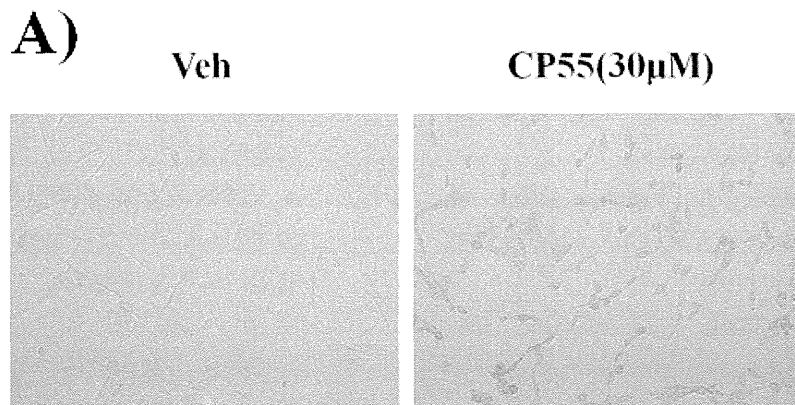


Fig. 1. Synthetic cannabinoid receptor agonist CP-55,940-induced cytotoxicity in human rhabdomyosarcoma cells. A) Cytotoxicity was evaluated following 120 min exposure to CP-55,940 (30  $\mu$ M) in human rhabdomyosarcoma (RD) cells. Representative morphology of RD cells treated with CP-55,940 after 120 min. Magnification of the phase contrast picture is  $\times 100$ . RD cells were subjected bright field microscopy analysis. B) Cytotoxicity was evaluated following 2 h exposure to CP-55,940 (7.5 - 120  $\mu$ M). Data are expressed as percent of the 0.1% DMSO control, and are presented as means $\pm$ SEM from three total wells analyzed across two independent experiments.

\*\*P<0.01 vs. vehicle (Veh)-treated group.



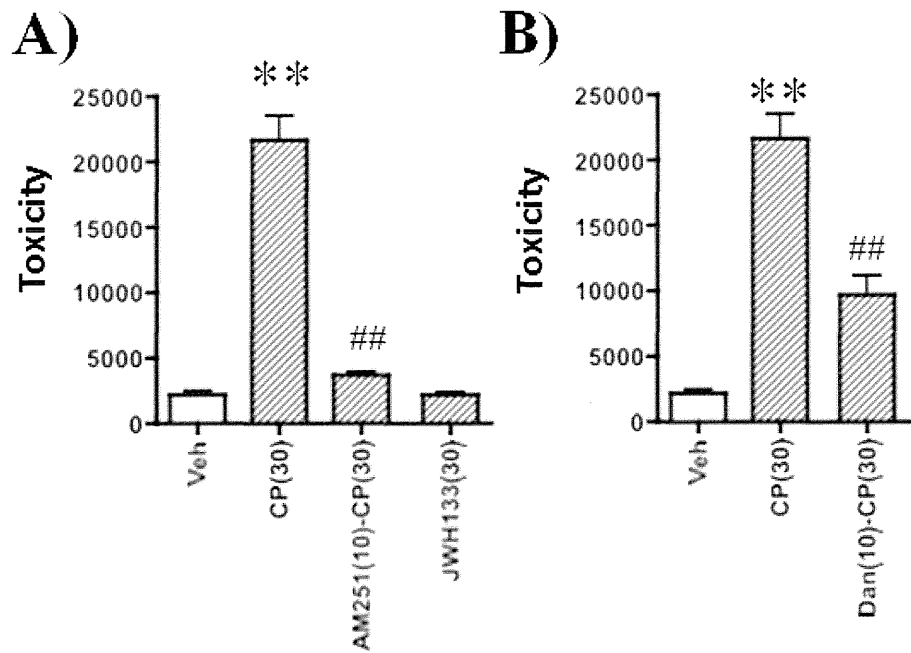


Fig. 2. Synthetic cannabinoid receptor agonist CP-55,940-induced cytotoxicity in human rhabdomyosarcoma cells. A) Cytotoxicity was evaluated following 120 min exposure to CP-55,940 (30  $\mu$ M) in human rhabdomyosarcoma (RD) cells. B) Dantrolene (10  $\mu$ M) was treated 15 min prior to CP-55,940 (30  $\mu$ M) treatment in RD cells. Data are expressed as percent of the 0.1% DMSO control, and are presented as means $\pm$ SEM from three total wells analyzed across two independent experiments.

\*\*P<0.01 vs. vehicle (Veh)-treated group. ##P<0.01 vs. CP-55,940 (CP)-treated group.

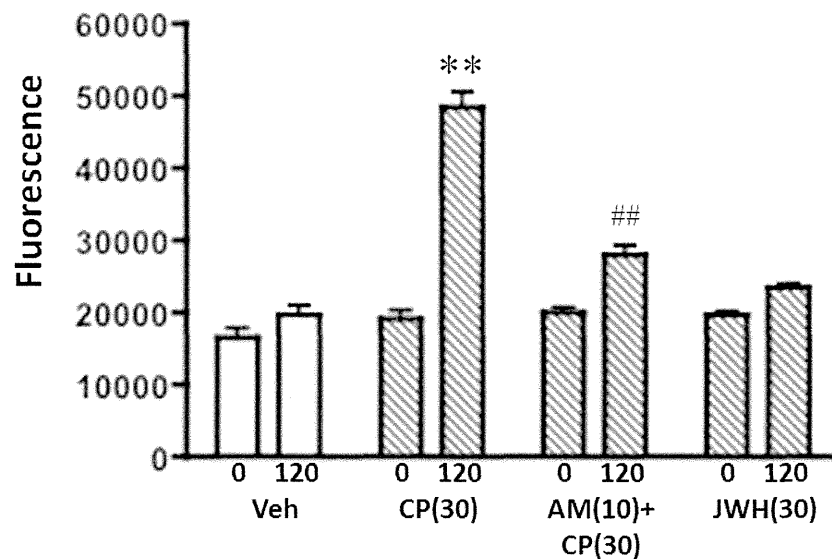


Fig. 3. Effect of the synthetic cannabinoid on the creatine kinase activity in human rhabdomyosarcoma cells. Rhabdomyosarcoma (RD) cells subsequently labeled with Fluo-4. Changes of intracellular  $Ca^{2+}$  were measured at 120 min after synthetic cannabinoid CP-55,940 (30  $\mu$ M) or JWH133 (30  $\mu$ M) using a Flexstation II. 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 (10  $\mu$ M) was treated 15 min prior to the synthetic cannabinoid treatment (30  $\mu$ M).

\*\* $P < 0.01$  vs. basal level. ## $P < 0.01$  vs. CP-55,940 (30  $\mu$ M)-treated group.