

Fig. 2. MRM chromatograms of cannabinoids using 2-EP column

Concentration: 100ppb each. The SFC-ESI-MS/MS conditions are described in the experimental section and Table 1.

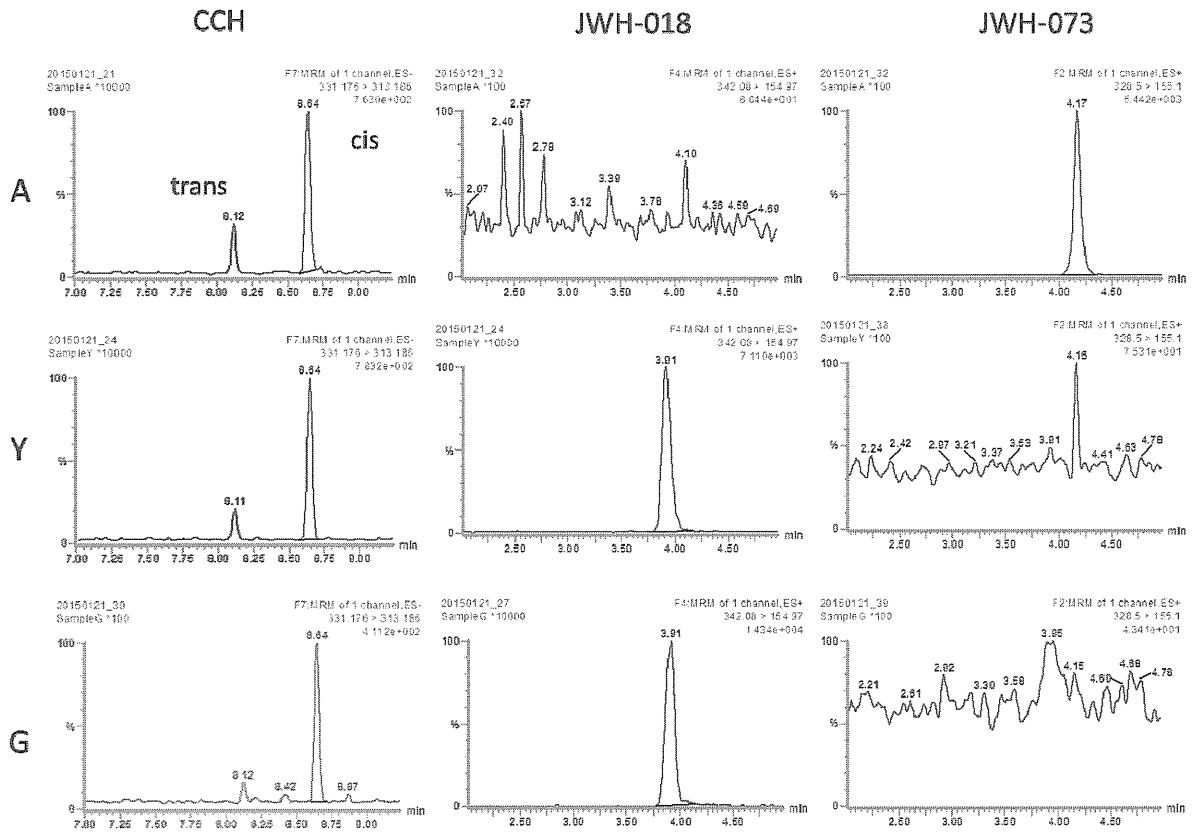


Fig. 3. SFC-ESI-MS/MS determination of dried plant pieces products (A, Y and G) using 2-EP column.

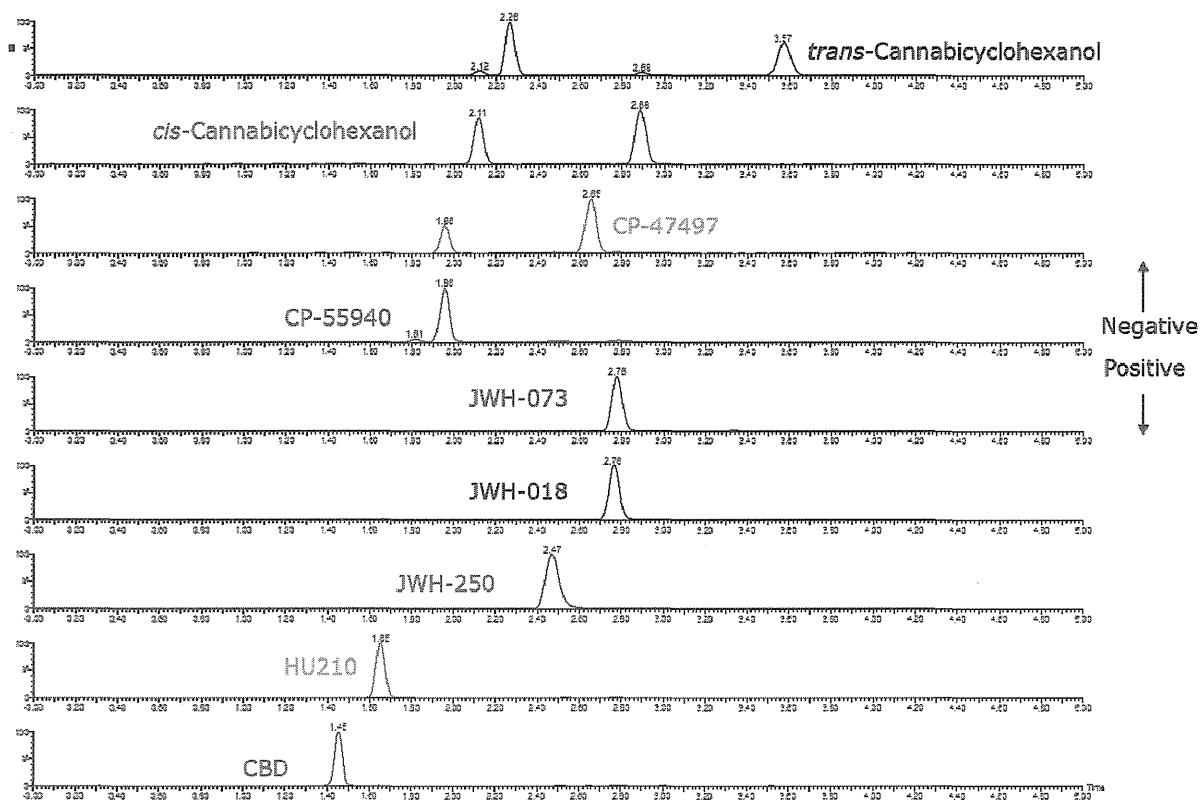


Fig. 4. MRM chromatograms of cannabinoids using AMY1 column

Concentration: 100ppb each. The SFC-ESI-MS/MS conditions are described in the experimental section and Table 2.

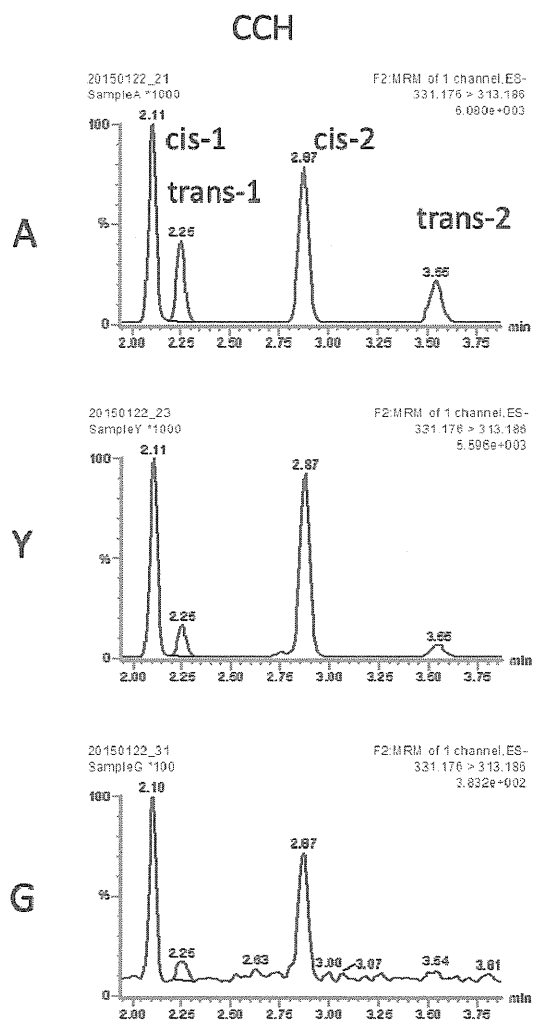


Fig. 5. SFC-ESI-MS/MS determination of CCH in dried plant pieces products (A, Y and G) using AMY1 column.

The SFC-ESI-MS/MS conditions are described in the experimental section and Table 2.

分担研究課題:違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究
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

—違法ドラッグ成分の活性評価法の開発—

研究要旨 違法ドラッグを迅速に規制するためにはコンピュータを用いた活性予測が有効である。本研究ではコンピュータを用いた化学計算による活性予測法を開発する。本年度は、平成26年1月に導入されたカチノン系化合物の包括規制後、新たに包括規制範囲外化合物として出現している長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物に着目して、2D-QSAR法を用いた活性予測を検討した。

A. 研究目的

違法ドラッグが大きな社会問題となっている。そこで、違法ドラッグを速やかに規制するためには、違法ドラッグの迅速な評価法が必要である。本研究では、それら違法ドラッグ類縁薬物のコンピュータを用いた化学計算によるインシリコ評価法を開発することを目的とする。

カチノン系化合物は、近年の危険ドラッグ市場において、合成カンナビノイドと共に最も流通している化合物群である。平成26年1月にはカチノン系化合物474化合物(既規制化合物を除く)が、新たに包括的に指定薬物として指定された。包括規制後、包括範囲内化合物の流通は大きく減少したが、包括規制と前後して特に長鎖アルキル基を有する化合物や、ベンゼン環状に複数の置換基を有する範囲外のカチノン系化合物が出現した[1]。

本年度は2D-QSAR(定量的活性相関)法を用いて、長鎖アルキル基を有するカチノン系化合物の活性予測を行った。

B. 研究方法

QSAR式の構築には化学計算パッケージMOEを使った。また、モデル構築のために活性既知類似35化合物の活性値としては、ドパミン

取り込み作用に対する50%抑制濃度(IC₅₀値)を用いた。(表1,表2) QSAR(定量的活性相関)法はAutoQuaSAR法を使って妥当なQSARモデル式を構築した。求めたQSAR式より35化合物の活性予測を行った。QSARモデル式で用いた記述子は、MOE上で動作するAutoQuaSARプログラムによって、MOEに搭載されている184のすべての2D記述子から選択されたものである。QSAR式は交差検定のR²(相関係数の2乗)が最も良いものを用いた。

C. 研究結果

新規7化合物(29~35)を加えた35化合物から構築したQSAR式を図3に示した。QSAR式によって求めた35化合物の活性予測値を表3に示した。昨年度までに28化合物から構築した旧QSAR式によって求めた活性予測[2]を併記した。

D. 考察

QSARを用いた予測法に置いては、既知である類似化合物の活性データの有無がデータの信頼性に大きく係わって来ることが最大の問題点である。

E. 結論

35 化合物から構築した QSAR 式を用いた場合の方がより、実測値近い予測値を得られた。今後長鎖アルキル基を有するカチノン系の予測に用いると効果的であると考えられる。

F. 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」(H24-医薬一般-009)平成 25 年度研究分担報告「指定薬物包括規制前後における違法ドラッグの流通変化について」(花尻(木倉)瑠理)。
- 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」(H24-医薬一般-009)平成 25 年度研究分担報告「違法ドラッグ成分の活性評価法の開発」(栗原正明)。

F. 研究発表等

論文発表
特になし。
学会発表
特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

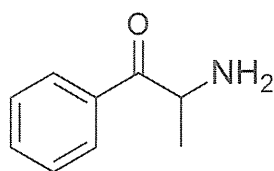


図1:カチノン(Cathinone)

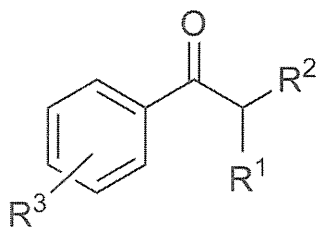
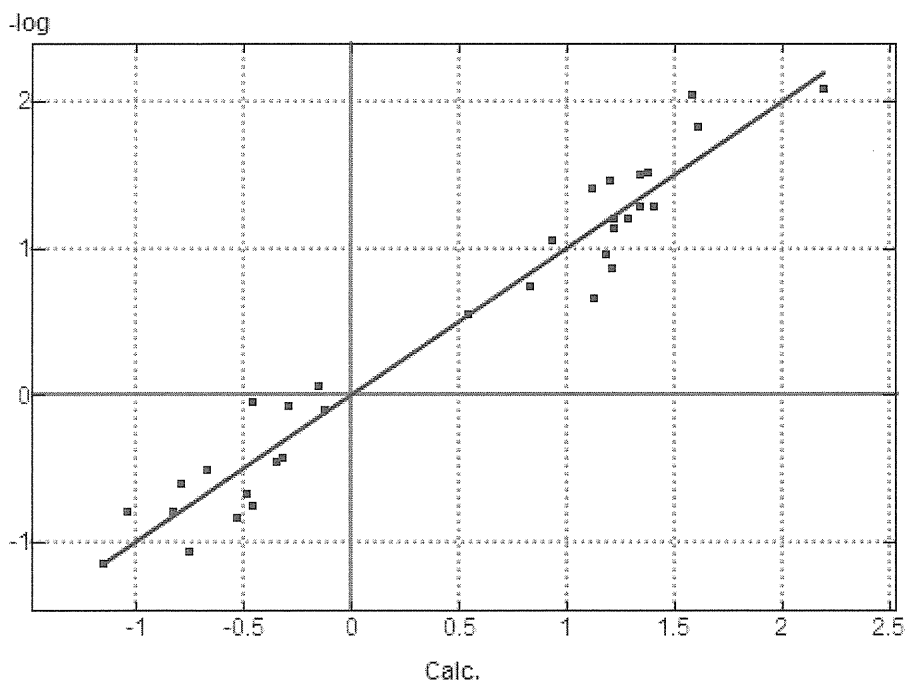


図2:カチノン系化合物

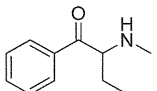
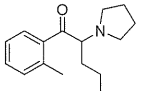
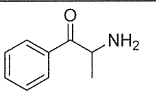
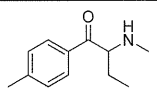
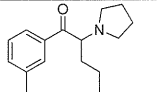
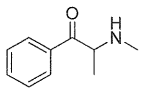
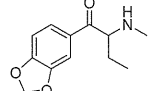
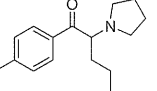
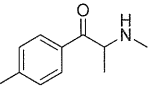
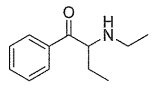
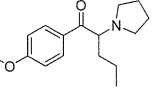
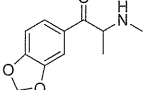
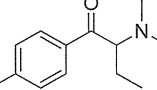
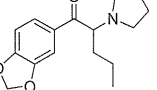
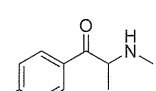
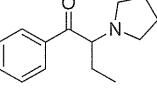
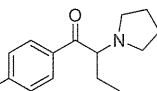
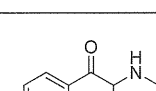
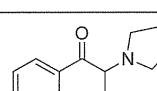
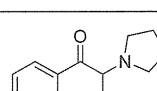
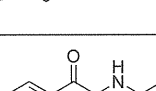
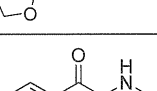
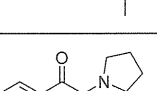
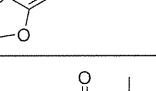
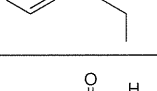
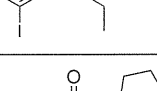
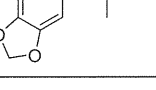
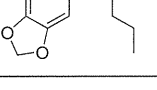


Const.	*	Desc.	
+ 1.774716			
+ 0.828153	*	PEOE_VSA-0	Total negative 0 vdw surface area
+ 0.822503	*	PEOE_VSA-1	Total negative 1 vdw surface area
- 0.872916	*	SlogP_VSA5	Bin 5 SlogP (0.15, 0.20]
- 0.831441	*	SlogP_VSA7	Bin 7 SlogP (0.25, 0.30]
- 0.875713	*	SlogP_VSA9	Bin 9 SlogP (0.40, 1.0]
- 0.838122	*	SMR_VSA4	Bin 4 SMR (0.390, 0.440]
+ 0.843821	*	SMR_VSA7	Bin 7 SMR (0.560, 1.0]

$$R^2=0.949279、XR^2=0.886425$$

図3 35 化合物から構築した QSAR

表1 ドパミン取り込み阻害活性が既知の化合物とその活性 (IC₅₀ 値, μM)

	カチノン系化合物	DAT (μM)						
			10		2.70	20		0.063
1		14	11		6.92	21		0.063
2		1.12	12		2.90	22		0.035
3		3.31	13		1.21	23		0.283
4		4.82	14		6.36	24		0.031
5		6.35	15		0.138	25		0.185
6		11.7	16		0.110	26		0.040
7		5.68	17		1.27	27		0.052
8		4.04	18		0.874	28		0.032
9		2.40	19		0.052			

- 1) Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME; Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro; *Br J Pharmacol.* 2013, 168, 458-470.
- 2) Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW, Hanson GR.; Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function.; *Eur J Pharmacol.* 1999, 382, 45-49.
- 3) Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK.; 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors.; *J Med Chem.* 2006, 49, 1420-32.

表 2 追加した7化合物の活性値

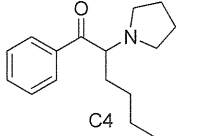
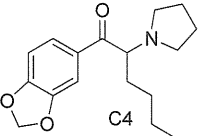
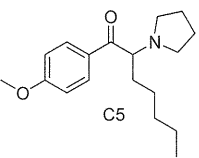
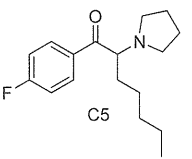
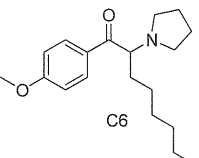
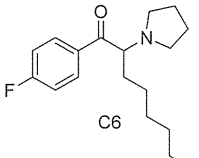
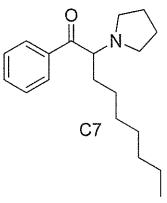
	新規カチノン系化合物	DAT (μM)
29	 C4	0.015
30	 C4	0.0092
31	 C5	0.088
32	 C5	0.073
33	 C6	0.22
34	 C6	0.77
35	 C7	0.0084

表3 QSAR 用いた活性既知物質の予測値

番号	実測 DAT (μ M)	旧 QSAR	新 QSAR	番号	実測 DAT (μ M)	旧 QSAR	新 QSAR
1	14	5.5	14.0	19	0.052	0.05	0.04
2	1.12	6.5	2.87	20	0.063	0.06	0.06
3	3.31	7.7	4.62	21	0.063	0.06	0.05
4	4.82	5.2	3.06	22	0.035	0.06	0.04
5	6.35	15.1	10.8	23	0.283	0.12	0.29
6	11.7	8.3	5.59	24	0.031	0.04	0.04
7	5.68	5.2	2.84	25	0.185	0.13	0.15
8	4.04	7.4	6.15	26	0.040	0.07	0.08
9	2.40	0.7	0.13	27	0.052	0.07	0.05
10	2.70	2.0	2.08	28	0.032	0.07	0.05
11	6.92	2.3	3.35	29	0.015	0.016	0.025
12	2.90	1.6	2.22	30	0.0092	0.01	0.026
13	1.21	2.0	1.93	31	0.088	0.011	0.12
14	6.36	3.3	6.73	32	0.073	0.011	0.06
15	0.138	0.18	0.06	33	0.22	0.0033	0.07
16	0.110	0.14	0.06	34	0.77	0.0034	0.04
17	1.27	0.6	1.33	35	0.0084	0.00045	0.006
18	0.874	0.5	1.42				

分担研究課題: 違法ドラッグ成分の危害影響予測手法に関する研究
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

—3,4-ジクロロメチルフェニデートの合成—

研究協力者: 出水 庸介 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

研究要旨 平成26年4月に指定薬物として規制された3,4-ジクロロメチルフェニデートについて、鑑定分析用の分析用標品を確保することを目的とし、3,4-ジクロロメチルフェニデートのトレオ(*threo*-5)体およびエリスロ(*erythro*-5)体の合成を行った。

A. 研究目的

メチルフェニデートは強い中枢興奮作用を有し、日本においては、第一種向精神薬として規制されている化合物である。一方、リタリンの商品名で、ナルコレプシーの治療薬として処方される医療用医薬品でもある。リタリンは、過去にうつ病に対する効能効果が適用されていたが、長期多量摂取による依存症、また不正譲渡や不正販売による乱用が大きな社会問題となり、平成19年10月に、適応症から難治性・遷延性うつ病が削除された。しかし、その後も乱用が認められている。また、近年、本化合物の構造類似化合物が次々と危険ドラッグ市場に出現しており[1]、平成25年1月にはエチルフェニデートが、平成26年4月には3,4-ジクロロメチルフェニデートが、指定薬物として規制された。これらの化合物は、構造中に2つの活性中心を有し、それぞれ4種類の光学異性体が存在する。法律では、異性体に関する規定はないため、4種類すべての異性体が規制対象となるが、トレオ体とエリスロ体は、通常のカラムを用いても、GCやLCのクロマトグラフィーにより分離することが予測される。そのため、鑑定分析において、トレオ体とエリスロ体両方の分析用標品を確保する必要がある。

本研究では、分析用標品に供するため3,4-ジクロロメチルフェニデートのトレオ(*threo*-5)体およびエリスロ(*erythro*-5)体の合成を検討した。

B. 研究方法

合成スキームは図1に示した。3,4-dichlorobenzyl cyanide に t-BuOK を用いて2-bromopyridineを反応させ化合物1を合成した。化合物1を濃塩酸で加水分解し、化合物2とした。化合物2に PtO₂ を触媒として水素添加を行い、化合物3を合成した。化合物3を濃塩酸で加水分解し化合物4とした。化合物4はシリカゲルクロマトグラフィーで精製(酢酸エチル/メタノール = 4/1)することで *threo*-5, *erythro*-5 を得た。それぞれ塩酸塩として再結晶を行いさらに精製を行った。詳細を以下に記載した。

1. 2-(3,4-Dichlorophenyl)-2-(pyridin-2-yl)-acetonitrile (1) の合成

Potassium tert-butoxide (6.15 g, 55mmol) の THF (30 mL) 溶液に、THF (10 mL) に溶解した 3,4-dichlorobenzyl cyanide (9.3 g, 50mmol) を窒素雰囲気下 10 分間かけて滴下した。室温下で

30 分間攪拌した後、THF (10 mL) に溶解した 2-bromopyridine (4.25 mL, 50mmol) を 1 時間かけて滴下した。室温下で 1 時間攪拌した後、70°C で 15 時間加熱還流を行った。THF を減圧下留去し、水 (50 mL) を加え酢酸エチル (100 mL) で 3 回抽出を行った。抽出した有機層を水 (100 mL) で洗浄し、次いで 6M 塩酸 (30 mL) で 4 回抽出した。抽出した塩酸水層を 15% の水酸化ナトリウム水溶液で pH>11 に調整し、酢酸エチル (100 mL) で 3 回抽出を行った。抽出した酢酸エチル層を水 (50 mL) で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。酢酸エチルを減圧下留去した残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン/酢酸エチル = 3/1) することで、

2-(3,4-dichlorophenyl)-2-(pyridin-2-yl)acetonitrile (1) (3.4 g, 26%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.61 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.76 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.41-7.55 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 2H), 5.27 (s, 1H).

2. 2-(3,4-Dichlorophenyl)-2-(pyridin-2-yl)-acetamide (2) の合成

化合物 1 (3.3 g, 12.5mmol) に 12M 塩酸 (30 mL) を加え、室温で 72 時間攪拌した。反応液に氷水 (100 mL) を加えた後に、15% の水酸化ナトリウム水溶液にて pH>11 に調整しジクロロメタン (100 mL) で 3 回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、ジクロロメタンを減圧下留去した残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製 (酢酸エチル / メタノール = 4/1) することで 2-(3,4-dichlorophenyl)-2-(pyridin-2-yl)acetamide (2) (1.8 g, 51%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.62 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.93 (brs, 1H), 7.72 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.25-7.31 (m, 3H), 5.89 (br s, 1H), 4.93 (s, 1H).

3. 2-(3,4-Dichlorophenyl)-2-(piperidin-2-yl)-

acetamide hydrochloride (3) の合成

化合物 2 (1.6 g, 5.7mmol) の酢酸 (30 mL) 溶液に酸化白金 (500 mg) を加え、水素 (30-40psi) 雰囲気下、室温で 48 時間攪拌した。反応後、酸化白金をセライト除去し酢酸を減圧下留去した。残渣に 6M 塩酸 (10 mL) を加え、室温にて 10 分間攪拌した後、塩酸を減圧下留去することで 2-(3,4-dichlorophenyl)-2-(piperidin-2-yl)acetamide hydrochloride (3) を得た。この化合物は生成することなく次の反応に用いた。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 7.14-7.49 (m, 3H), 3.56-3.72 (m, 1H), 3.14-3.30 (m, 1H), 2.81-2.94 (m, 1H), 2.00-2.31 (m, 1H), 1.25-1.79 (m, 6H).

4. 2-(3,4-Dichlorophenyl)-2-(piperidin-2-yl)-acetic acid (4) の合成

化合物 3 (5.7mmol) に 6M 塩酸 (30 mL) を加え 6 時間加熱還流を行った。反応後、塩酸を減圧下留去することで

2-(3,4-dichlorophenyl)-2-(piperidin-2-yl)acetic acid (4) を得た。この化合物は生成することなく次の反応に用いた。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 7.12-7.49 (m, 3H), 3.59-3.75 (m, 1H), 3.19-3.32 (m, 1H), 2.83-2.93 (m, 1H), 2.02-2.32 (m, 1H), 1.46-1.78 (m, 6H).

5. Methyl 2-(3,4-dichlorophenyl)-2-(piperidin-2-yl)-acetate hydrochloride (5) の合成

化合物 4 (5.7mmol) に 1M 塩酸メタノール (30 mL) 溶液を加え室温にて 16 時間攪拌を行った。反応後、溶媒を減圧下留去し、残渣に 1M 水酸化ナトリウム水溶液を加え pH=11 に調整した。次いで、ジクロロメタン (100 mL) で 3 回抽出を行い、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した。ジクロロメタンを減圧下留去した残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製 (酢酸エチル/メタノール = 4/1) することで methyl (S)-2-(3,4-dichlorophenyl)-2-((S)-piperidin-2-yl)acetate (*threo*-5) (223mg, 13%), および methyl

(S)-2-(3,4-dichlorophenyl)-2-((R)-piperidin-2-yl)acetate (*erythro-5*) (257mg, 15%) を得た. それぞれ得られた *threo-5* および *erythro-5* に 1M 塩酸メタノール(10 mL)溶液を加え, 室温にて 1 時間攪拌を行った後に溶媒を減圧下留去した. 残渣をヘキサン/酢酸エチル(1/1)に溶解し再結晶を行うことで, *threo-5* および *erythro-5* の塩酸塩を得た.

threo-5 hydrochloride : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.78 (br s, 1H), 8.53 (br s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.69 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.58 (dd, $J = 12.0, 22.8$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J = 10.4, 24.0$ Hz, 1H), 2.10 (dd, $J = 13.6, 25.6$ Hz, 1H), 1.75-1.90 (m, 3H), 1.36-1.44 (m, 2H); [LR-ESI(+)]: 302.0583[M+H] $^+$.

erythro-5 hydrochloride : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.45 (br s, 1H), 8.56 (br s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.25 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.42 (dd, $J = 11.2, 20.4$ Hz, 1H), 3.32 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.68-2.73 (m, 1H), 1.78-2.00 (m, 5H), 1.44-1.50 (m, 1H); [LR-ESI(+)]: 302.0583 [M+H] $^+$.

C. 研究結果

3,4-dichlorobenzyl cyanide を出発原料として4ステップで 3,4-ジクロロメチルフェニデートを合成した. 合成した *threo-5* hydrochloride と別途確保した *threo-5* hydrochloride 標準品[2]の ^1H NMR は良い一致を示した. (図2)

D. 考察

シリカゲルクロマトグラフィーを用いて *Threo* 体, *erythro* 体を分離できた.

E. 結論

3,4-dichlorobenzyl cyanide を出発原料として4ステップで 3,4-ジクロロメチルフェニデートを合成した. シリカゲルクロマトグラフィーを用いて *Threo* 体, *erythro* 体を分離し, さらに再結晶で精製した. 合成した *threo-5* hydrochloride と *threo-5* hydrochloride 標準品の ^1H NMR は良い一致を示した.

F. 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政策研究事業)「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26年度研究分担報告「GC-MS 及び LC-MS 分析で注意が必要な指定薬物について」(花尻(木倉)瑠理).
- 2) N. Uchiyama, S. Matsuda, M. Kawamura, Y. Shimokawa, R. Kikura-Hanajiri, K. Aritake, Y. Urade, Y. Goda, Characterization of four new designer drugs, 5-chloro-NNEI, NNEI indazole analog, α -PHPP and α -POP, with 11 newly distributed designer drugs in illegal products. *Forensic Sci. Int.*, 243, 1-13 (2014).

F. 研究発表等

論文発表

特になし.

学会発表

特になし.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

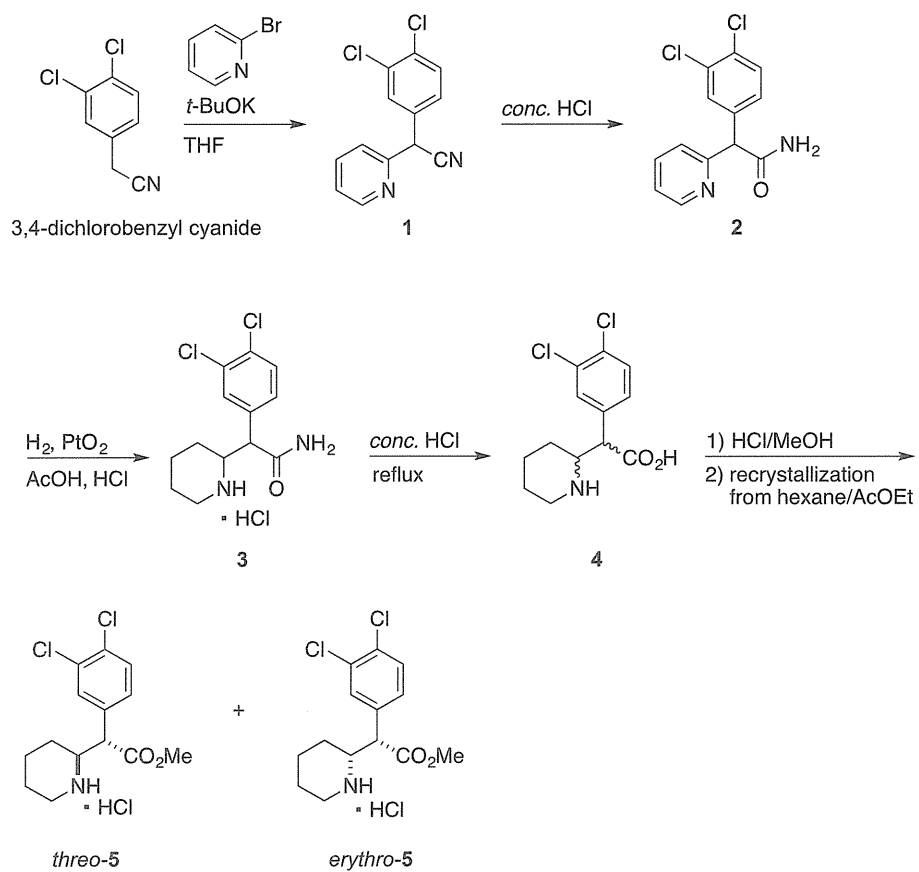


図1 合成スキーム

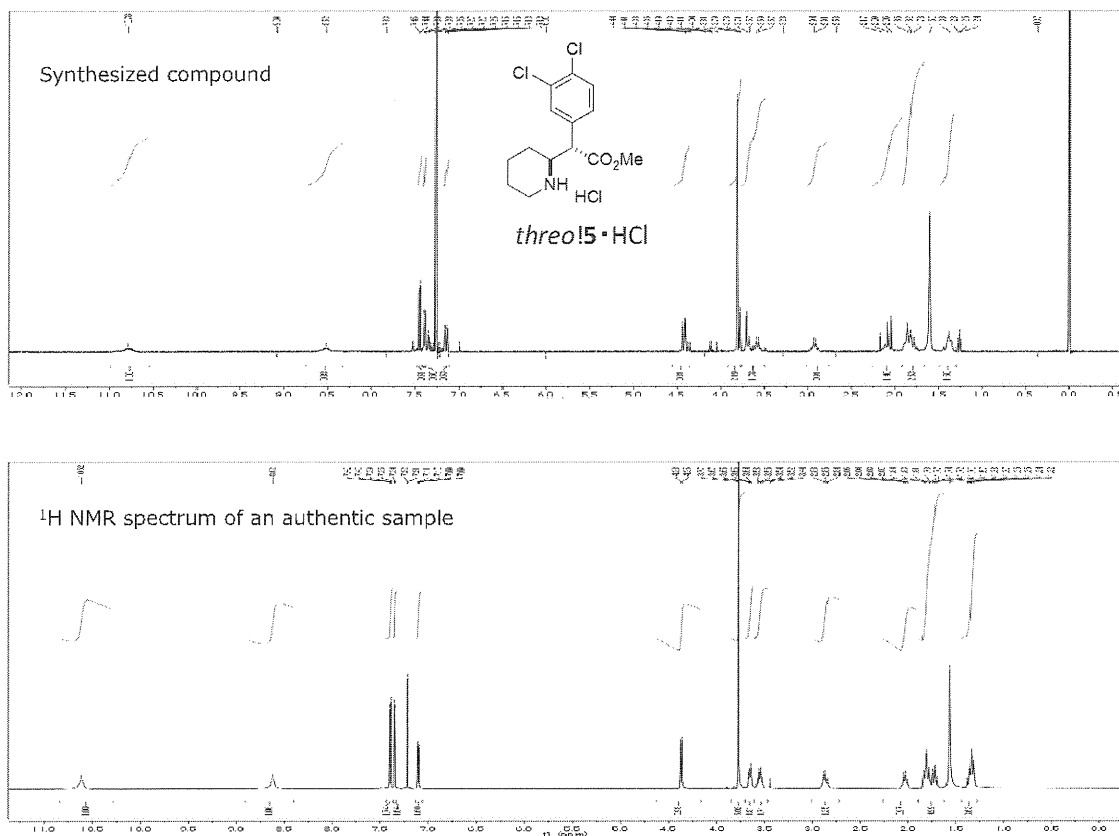


図2 NMRチャート

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

—ラット初代培養ミクログリアを用いた合成カンナビノイド系危険ドラッグの薬理作用評価—

研究協力者:佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 室長

研究協力者:最上 由香里 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 期間業務職員

研究要旨: 合成カンナビノイド(CB)系化合物は、中枢神経細胞に発現する CB1 受容体を介した作用ばかりではなく、CB2 受容体を介しても中枢機能に変調をもたらす。中枢神経細胞には CB2 受容体は発現していないため、CB2 受容体の活性化によって生じる中枢機能の変調は、ミクログリアに発現するCB2受容体に起因すると考えられる。危険ドラッグとして問題となっている合成CB系化合物の中枢機能変調を同定する実験系として、脳由来ミクログリアのCB2受容体を介したERKリン酸化パスウェイの利用可能性を検討した。ラット初代培養ミクログリアにCB2受容体選択的アゴニストであるJHW015およびHU-308はミクログリアのERK1、2のリン酸化を誘導し、このリン酸化はCB2受容体選択的アンタゴニストであるSR144528で抑制された。ミクログリアを利用してウエスタンブロッティング法を用いて、合成CB系化合物のCB2受容体への作用を検出出来ることがわかった。今後、感度とスループットを改善し、新たなCB2受容体活性化の評価系を確立する。

A. 研究目的

危険ドラッグの中枢神経系に対する作用を定量的に評価することが、危険ドラッグの人体に及ぼす有害な作用を推定する上で必須であり、危険ドラッグの法的規制の科学的根拠ともなる。合成カンナビノイド(CB)系危険ドラッグが作用すると考えられるCB受容体には、CB1受容体とCB2受容体の2種類が存在しており、中枢神経系においては、神経細胞にはCB1受容体が、ミクログリアにはCB1受容体とCB2受容体の両方が発現している(1, 2)。CBの中枢神経に対する作用は、CB1受容体を介した神経細胞への作用のみならず、ミクログリアに発現するCB2受容体を介した機能変調も報告されている(3, 4)。

中枢の免疫担当細胞であるミクログリアは、脳の恒常性を維持するだけでなく、積極的に神

経活動に関与することが明らかとなっており(5-8)、ミクログリアの機能が損なわれるによって、うつ病や自閉症などの精神疾患を発症しうることが報告されている(9, 10)。アルツハイマー病や、多発性硬化症、慢性炎症性疼痛などの病態時にも、ミクログリアが活性化してCB2受容体の発現が増大する(11-14)。合成CBがCB2受容体を介してミクログリアに作用して中枢神経系の変調を起こすことが報告されている(3)。また、合成CBの繰り返し投与により、脳内のミクログリアが増加することが報告されており(4)、危険ドラッグがミクログリアの機能に影響を及ぼすことによって、様々な有害な作用を引き起こしている可能性がある。そこで本研究では、これまで開発されていなかったCB2受容体に対する合成CB系危険ドラッグの定量的な作用を評価することを試みた。

B. 研究方法

ラットミクログリアの初代培養

生後 1 日齢の Wistar ラットの脳皮質領域から、ミクログリアを含む混合グリア細胞を調製して 7-10 日間培養した後、混合グリア細胞内で増殖した弱付着性のミクログリア細胞を回収して実験に用いた。なお、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。

ウェスタンブロッティング解析

初代培養ミクログリアを 2×10^5 cells/dish の濃度でディッシュに播種し、血清除去を 2 時間行った後、様々な濃度の CB 受容体アゴニスト、アンタゴニストを処置した。氷冷によって反応を停止させた細胞を溶解させて SDS-PAGE によって分離した後、PVDF メンブレンに転写し、CB1, CB2, β actin, リン酸化 ERK1/2, Total ERK1/2 各各種特異的抗体を用いて解析を行った。CB1, CB2 受容体の発現量は β アクチンで補正し、ERK の活性化はリン酸化 ERK1, 2 を Total ERK1, 2 で補正した。

免疫染色

初代培養ミクログリアを 1×10^5 cells/well の密度でスライドチャンバーに播種した後、パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキング後、CB1, CB2, Iba1, DAPI 各各種特異的抗体で染色した。

解析は NIKON A1 を用いて行った。

C. 研究結果

ヒトの正常な脳内に存在するミクログリアには、CB1, CB2 受容体いずれも発現しているが、その発現量はわずかであり、アルツハイマー病や、多発性硬化症、慢性炎症性疼痛などなど脳に異常が生じた際に CB2 受容体の発現が増大することが報告されている(15, 16)。そこで、ラットから調製した初代培養ミクログリアに CB1, CB2 受容体が発現しているか検討を行った。ウェスタンブロット解析の結果、ラット初代培養ミクログリアには、CB1, CB2 受容体のいずれも発現することが確認

でき、特に CB2 受容体の発現量が高いことが明らかになった (Fig. 1A)。さらに、ミクログリアをリポポリサッカロイド (LPS) で活性化することで、無刺激のミクログリアと比べて CB2 受容体の発現量が高値を示した (Fig. 1B)。また、免疫染色においてもミクログリアの細胞体に CB2 受容体の発現が確認された (Fig. 1C)。

CB2 受容体は Gi 共役型の G タンパク質共役型受容体であり、そのシグナル伝達の下流で ERK の活性化を誘導することが知られており (17-19)、ミクログリアにおいても CB2 アゴニストが ERK の活性化を誘導することが報告されている(20)。そこで、CB2 受容体の選択的アゴニストである JHW015 をラット初代培養ミクログリアに処置し、用量依存的な ERK1, 2 のリン酸化作用をウェスタンブロット法によって定量的に評価した。その結果、JWH015 で刺激したミクログリアでは、刺激 10 分および 30 分後にコントロールと比較して、ERK1, 2 のリン酸化が増大しており (Fig. 2Aa)、刺激 10 分後では、コントロールと比較して有意な増大が確認できた (Fig. 2Ab)。次に、JWH015 の濃度を振ってラット初代培養ミクログリアを 10 分間刺激したところ、JWH015 刺激 1 および 10 μ M で有意な ERK1, 2 のリン酸化が確認された (Fig. 2B)。さらに、JWH015 による ERK1, 2 のリン酸化は CB2 受容体選択的インバースアゴニストである SR144528 を前処置することによって有意に抑制された。一方、CB1 受容体選択的アンタゴニストである AM251 の前処置では抑制されなかった。また、CB2 受容体選択的アゴニストである HU-308 の刺激でも同様の作用が認められた (Fig. 2C)。CB1 受容体選択的アゴニストである ACEA で刺激した初代培養ミクログリアでは ERK1, 2 のリン酸化は生じなかった (データ省略)。以上の結果から、ラット初代培養ミクログリアの CB2 受容体を刺激すると、ERK1, 2 のリン酸化が刺激濃度依存的に生じることが明らかになった。

次に、LPS で刺激することで活性化させたラット初代培養マイクログリアにおいて、CB2 受容体選択的アゴニスト JWH015 の作用を検討した。初代培養マイクログリアを 100 ng/mL の LPS で刺激すると、刺激 60 分後に ERK1、2 のリン酸化が確認された。JWH015 を 10 μ M で処置することで、LPS 刺激で誘導された初代培養マイクログリアの ERK1、2 のリン酸化は、ほぼ完全に抑制された (Fig. 3A)。本結果と同様に、LPS 処置したマイクログリアの ERK1/2 の活性化を CB2 アゴニストが抑制することが報告されている(19-21)。

無刺激のマイクログリアへの作用とは異なるこの LPS 刺激マイクログリアに対する JWH015 の作用について JWH015 の濃度を振って検討した結果、10 μ M で ERK1、2 のリン酸化を抑制したが、今回の検討で濃度依存性は確認できなかった (Fig. 3B)。LPS 刺激したマイクログリアにおける ERK1、2 のリン酸化に対する JWH015 の抑制作用が、CB2 受容体を介したものであるかを CB2 受容体選択的アンタゴニスト共存下での検討などで確認したい。

D. 考察

マイクログリアには CB1、CB2 受容体が発現しているが、CB1 受容体の機能的な作用についてはほとんど報告がない。脳の疾患時に活性化したマイクログリアでは CB2 受容体の発現が増加する。マイクログリアは、中枢の環境変化に応じて CB2 受容体を介した応答性を変化させることで中枢の恒常性を維持しているのではないかと考えられる。我々の検討においても CB2 受容体選択的アゴニストが、無刺激のラット初代培養マイクログリアにおいては ERK1、2 のリン酸化を誘導し、LPS で活性化したラット初代培養マイクログリアに対しては ERK1、2 のリン酸化を抑制するという相反する作用が確認された。炎症疾患時に活性化したマイクログリアの CB2 受容体を刺激するとマイクログリアが抗炎症的な応答を示すことが報告されている(22, 23)が、合成 CB 系の危険ドラッグを繰り返し投与

した際に脳内のマイクログリアが CB2 受容体を介してどのような反応をしているのであろうか。

今年度は、ラット初代培養マイクログリアに機能的な CB2 受容体が発現していること、初代培養マイクログリアを CB2 受容体選択的アゴニストで刺激すると濃度依存的な ERK1、2 のリン酸化が生じることが明らかになった。さらに、LPS 刺激で生じる初代培養マイクログリアの ERK1、2 のリン酸化は CB2 受容体アゴニストによって抑制されることを示した。今回示したウェスタンブロットによる解析ではスループットに欠けるため、今後、合成 CB 系危険ドラッグの評価を行うためにスループットを改善した実験系の開発を行いたい。

E. 結論

今年度は、ラット初代培養マイクログリアを用いて、無刺激時および LPS 活性化時で CB2 受容体を介した ERK1、2 のリン酸化応答に違いがあることをウェスタンブロット法にて定量的に評価した。今後、スループットの高い実験系を構築し、危険ドラッグとして問題となっている合成 CB 系化合物の中枢機能変調を同定する評価系の構築を目指す。

F. 参考文献

1. Atwood, B.K., Mackie, K. *Br J Pharmacol*, **160**(3), 467-479 (2010).
2. Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K. *Pharmacol Rev*, **62**(4), 588-631 (2010).
3. Cutando, L., Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Gomis-Gonzalez, M., Delgado-Garcia, J.M., Gruart, A., Maldonado, R., and Ozaita, A. *J Clin Invest*, **123**(7), 2816-2831 (2013).
4. Lopez-Rodriguez, A.B., Llorente-Berzal, A., Garcia-Segura, L.M., and Viveros, M.P. *Br*

- J Pharmacol*, **171**(6), 1435-1447 (2014).
5. Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. *Physiol Rev*, **91**(2), 461-553 (2011).
 6. Kreutzberg, G.W. *Trends Neurosci*, **19**(8), 312-318 (1996).
 7. Nakajima, K., and Kohsaka, S. Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res*, **17**(3), 187-203 (1993).
 8. Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. *J Neurosci*, **31**(45), 16064-16069 (2011).
 9. Blank, T., and Prinz, M. *Glia*, **61**(1), 62-70 (2013).
 10. Zhan, Y., Paolicelli, R.C., Sforazzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A.L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., et al. *Nat Neurosci*, **17**(3), 400-406 (2014).
 11. Martin-Moreno, A.M., Reigada, D., Ramirez, B.G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., and de Ceballos, M.L. *Mol Pharmacol*, **79**(6), 964-973 (2011).
 12. Arevalo-Martin, A., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., and Guaza, C. *J Neurosci*, **23**(7), 2511-2516 (2003).
 13. Ibrahim, M.M., Deng, H., Zvonok, A., Cockayne, D.A., Kwan, J., Mata, H.P., Vanderah, T.W., Lai, J., Porreca, F., Makriyannis, A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(18), 10529-10533 (2003).
 14. Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Huffman, J.W., and Layward, L. *Nature*, **404**(6773), 84-87 (2000).
 15. Stella, N. *Glia* **58**(9), 1017-1030 (2010).
 16. Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Fazzi, D., Mirandola, P., and Borea, P.A. *Br J Pharmacol*, **166**(8), 2371-2385 (2012).
 17. Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., and Casellas, P. *Eur J Biochem*, **237**(3), 704-711 (1996).
 18. Bouaboula, M., Dussossoy, D., and Casellas, P. *J Biol Chem*, **274**(29), 20397-20405 (1999).
 19. Romero-Sandoval, E.A., Horvath, R., Landry, R.P., and DeLeo, J.A. *Mol Pain*, **5**, 25 (2009).
 20. Merighi, S., Gessi, S., Varani, K., Simioni, C., Fazzi, D., Mirandola, P., and Borea, P.A. *Br J Pharmacol*, **165**(6), 1773-1788 (2012).
 21. Correa, F., Docagne, F., Mestre, L., Clemente, D., Hernangomez, M., Loria, F., and Guaza, C. *Biochem Pharmacol*, **77**(1), 86-100 (2009).
 22. Cabral, G.A., and Marciano-Cabral, F. *J Leukoc Biol*, **78**(6), 1192-1197 (2005).
 23. Cabral, G.A., Raborn, E.S., Griffin, L., Dennis, J., and Marciano-Cabral, F. *Br J Pharmacol*, **153**(2), 240-251 (2008).
- G. 研究発表
論文発表
1. Irie, T., Kikura-Hanajiri, R., Usami, M., Uchiyama, N., Goda, Y., Sekino, Y., MAM-2201, a synthetic cannabinoid drug of abuse, suppresses the synaptic input to cerebellar Purkinje cells via activation of presynaptic CB1 receptors. *Neuropharmacology*, **in press** (2015).
 2. Fujieda, T., Koganezawa, N., Ide, Y., Shirao, T., Sekino, Y., An inhibitory pathway controlling the gating mechanism of the mouse lateral amygdala revealed by voltage-sensitive dye imaging, *Neurosci Lett*, **590**, 126-131 (2015).
 3. Fujimori, K., Takaki, J., Miura, M.,

- Shigemoto-Mogami, Y., Sekino, Y., Suzuki, T., Sato, K., Paroxetine prevented the down-regulation of astrocytic L-Glu transporters in neuroinflammation, *J. Pharamcol. Sci., J. Pharmacol. Sci.*, **127(1)**, 145-149 (2015).
4. Shigemoto-Mogami, Y., Fujimori, K., Ikarashi, Y., Hirose, A., Sekino, Y., Sato K., Residual metals in carbon nanotubes suppress the proliferation of neural stem cells, *Fundam. Toxcol. Sci.*, **1(3)**, 87-94 (2014).
5. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, JE., Sekino, Y., Sato, K., Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone, *J. Neurosci.*, **34(5)**, 2231-2243 (2014).
6. Irie, T., Matsuzaki, Y., Sekino, Y., Hirai, H., Kv3.3 channels harboring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.*, **592(Pt1)**, 229-247 (2014).
3. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, JE., Sekino, Y., The Discovery of a Population of Microglia Which Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal SVZ, 9th FENS forum of neuroscience, Milan, Italy (2014.7).

国内学会

1. 最上(重本) 由香里, 干川 和枝, 関野 祐子, 佐藤 薫: ミクログリアの活性状態に依存した血液脳関門のバリア機能への影響, 日本薬学会 第 135 年会, 神戸(2015.3).
2. 入江 智彦, 花尻(木倉) 瑠理, 宇佐見 誠, 内山 奈穂子, 合田 幸広, 関野 祐子: 新規違法ドラッグ MAM-2201 は CB1 受容体を介して神経伝達を強力に抑制し, 複雑スパイク誘発性の細胞内 Ca^{2+} 上昇を減弱させる, 生理研研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」(愛知, 2014.12)
3. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Sekino, Y., Sato, K., Development of in vitro blood-brain barrier model including microglia, Neuroscience2014, Yokohama (2014.9).
4. Kasahara, Y., Fujimori, K., Miura, M., Mogami, Y., Sekino, Y., Sato, K., Suzuki, T., Comparison of the effects of antidepressants on the microglial activation in LPS-inflammation model, Neuroscience2014, Yokohama (2014.9).
5. 入江 智彦, 花尻(木倉) 瑠理, 宇佐見 誠, 内山 奈穂子, 合田 幸広, 関野 祐子: 新規違法ドラッグ MAM-2201 は CB1 受容体を介して神経伝達を強力に抑制し, 複雑スパイク誘発性の細胞内 Ca^{2+} 上昇を減弱させる, Neuro2014 (神奈川, 2014.9)
- H. 知的所有権の取得状況
なし

学会発表

国際学会

1. Sato, K., Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa, K., Sekino, Y.: Microglia accelerate the maturation of barrier function of blood brain barrier, Sfn2014, Washington D.C., USA (2014.11).
2. Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Kanemura, Y., Shofuda, T., Fukusumi, H., Okada, Y., Okano, H., Shirao, T., Sekino, Y., Sato, K., Search for the human induced pluripotent stem cell-derived neurons capable of detecting the CNS-specific toxicity, SPS 14th annual meeting, Washington D.C., USA (2014.10).