

Fig. 12. LC-MS and GC-MS analyses of product K.

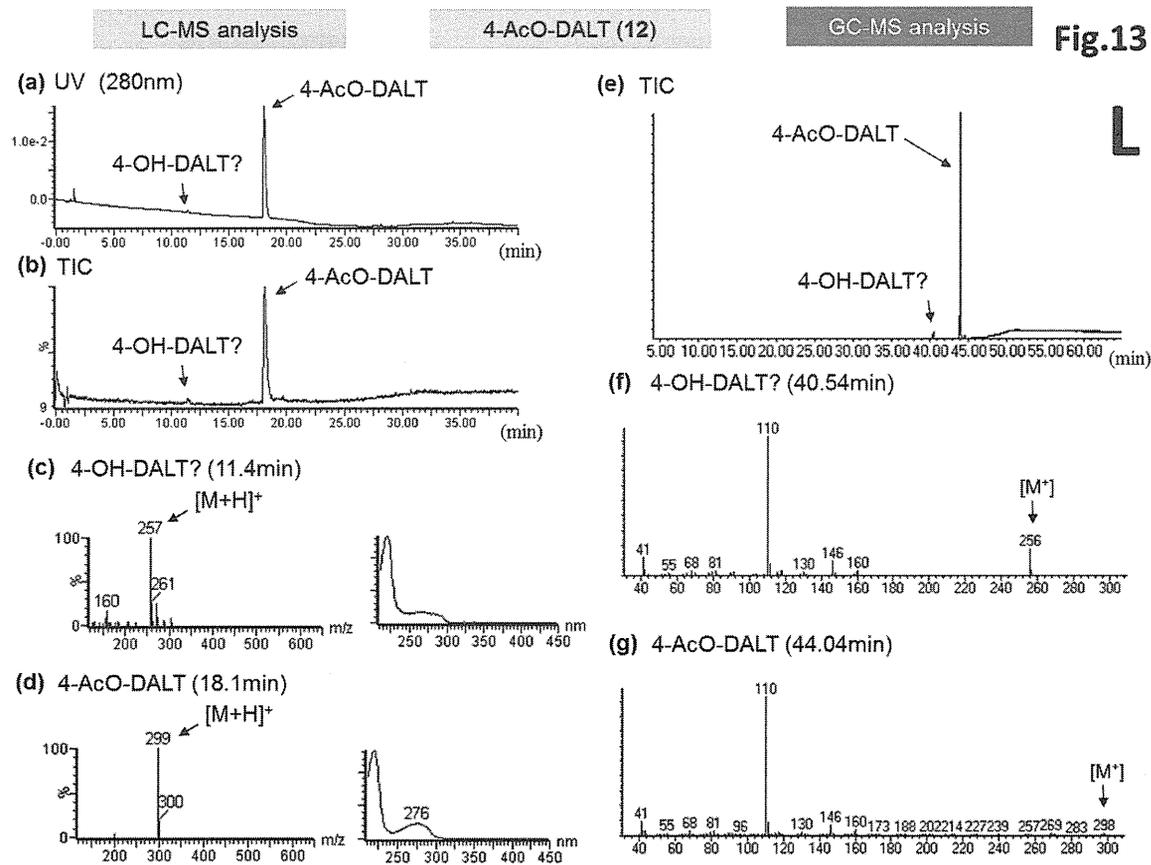


Fig. 13. LC-MS and GC-MS analyses of product L.

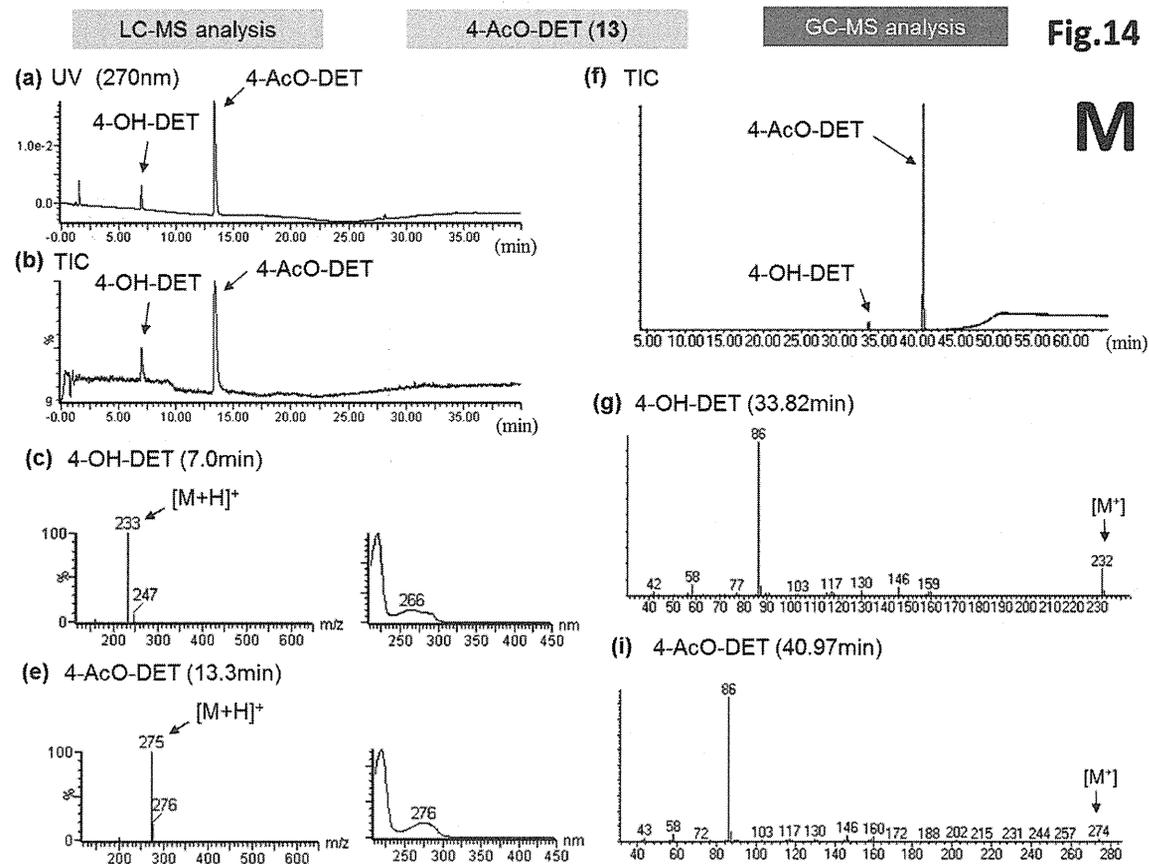


Fig. 14. LC-MS and GC-MS analyses of product M.

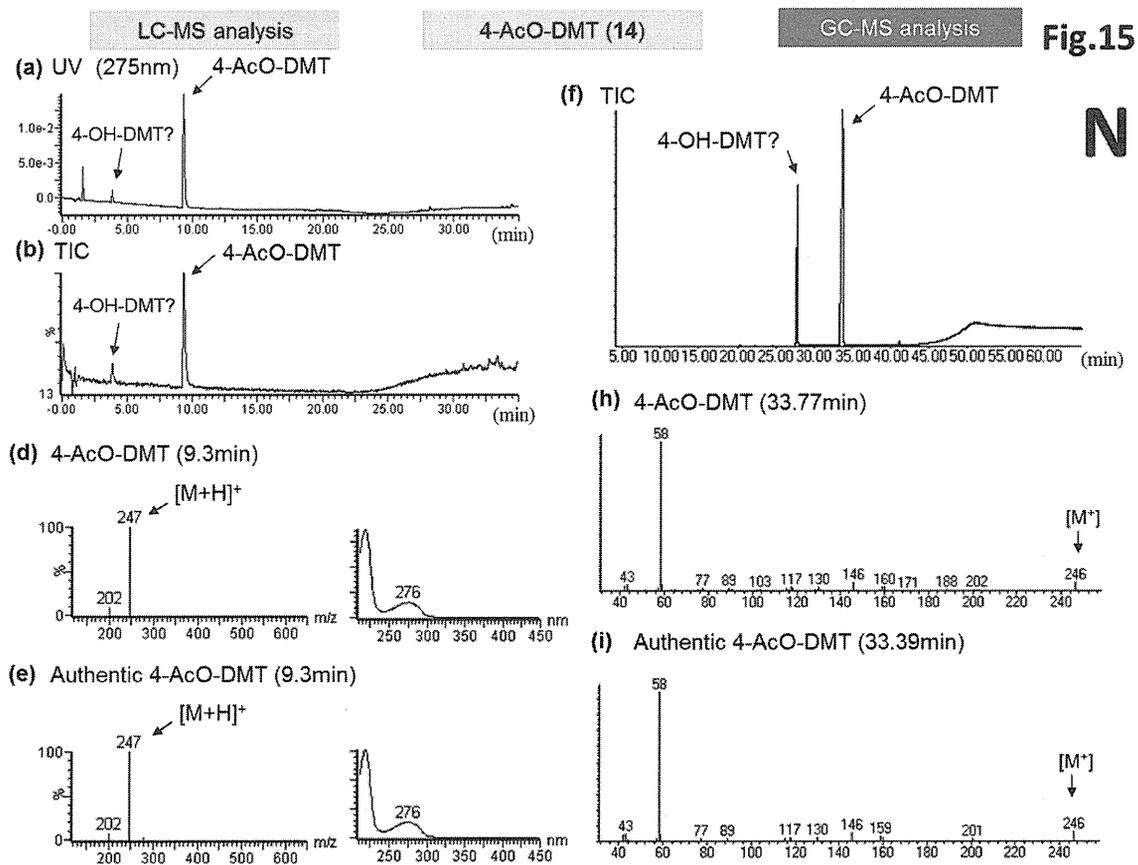


Fig. 15. LC-MS and GC-MS analyses of product N.

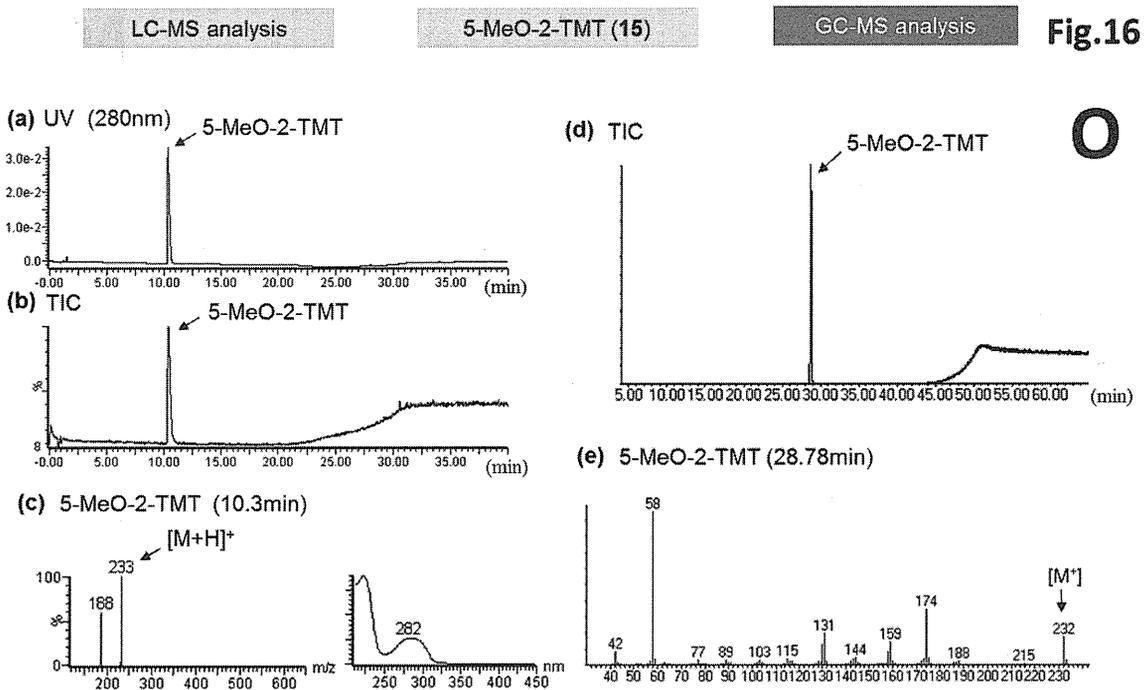


Fig. 16. LC-MS and GC-MS analyses of product O.

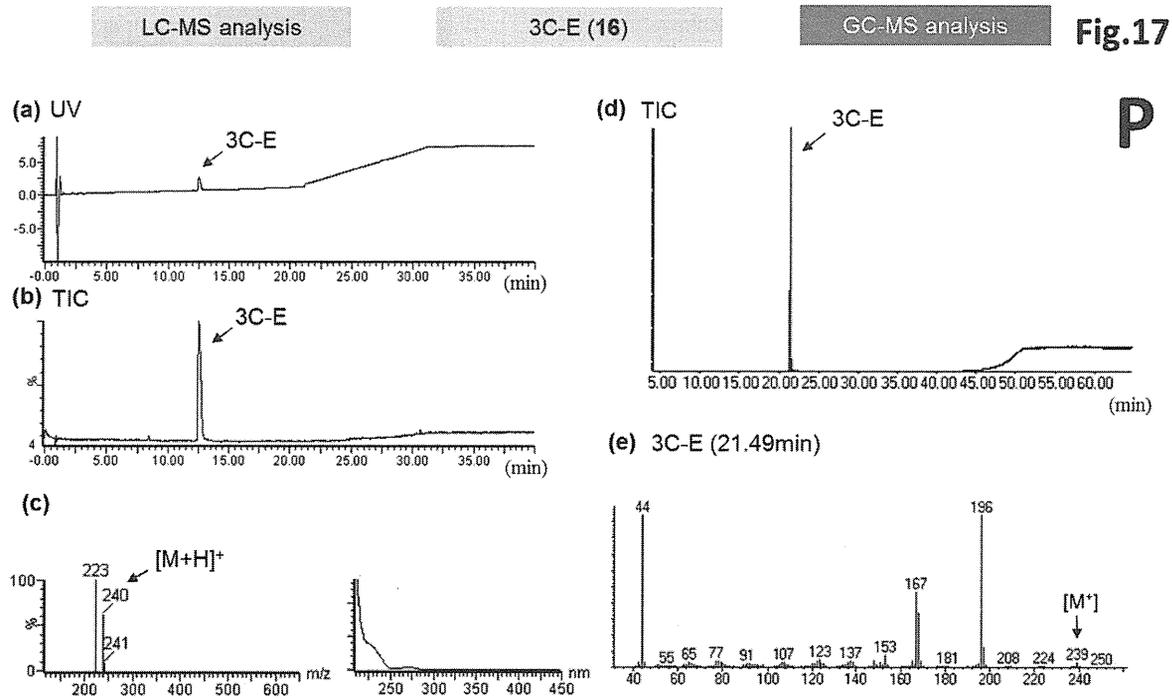


Fig. 17. LC-MS and GC-MS analyses of product P.

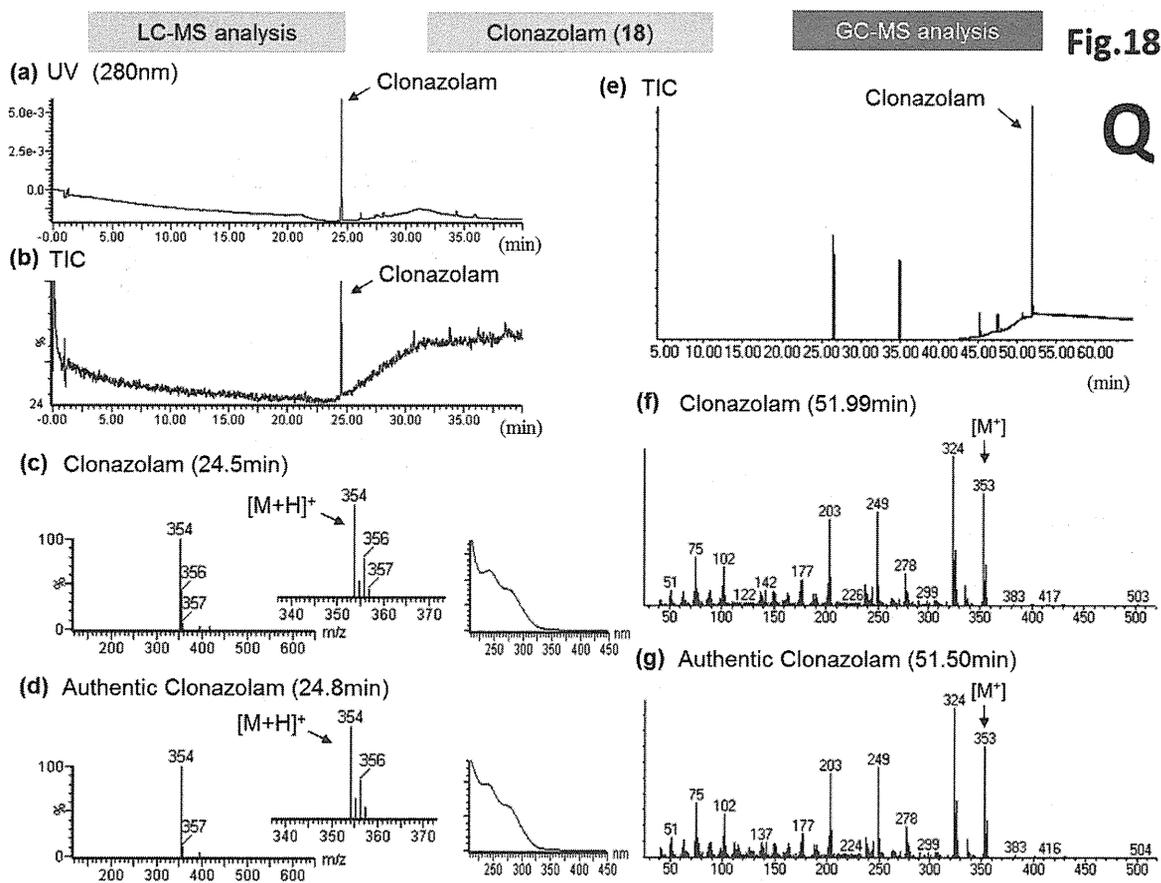


Fig. 18. LC-MS and GC-MS analyses of product Q.

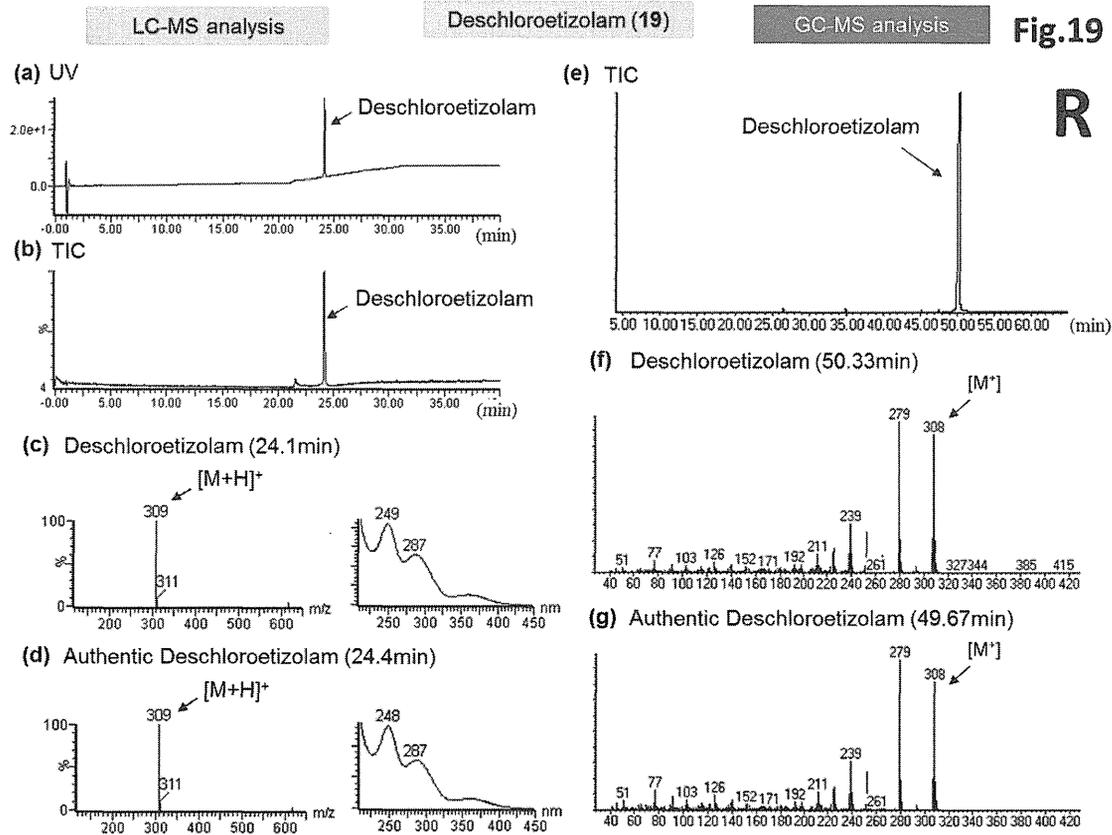


Fig. 19. LC-MS and GC-MS analyses of product R.

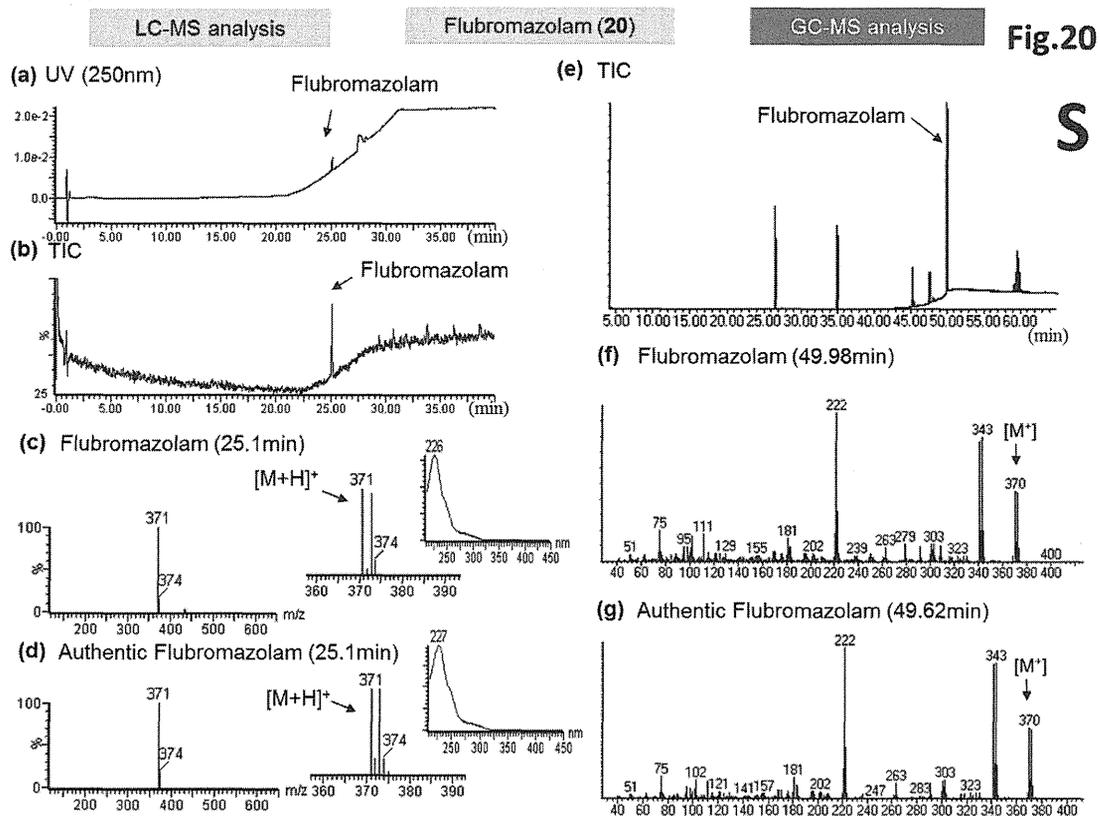


Fig. 20. LC-MS and GC-MS analyses of product S.

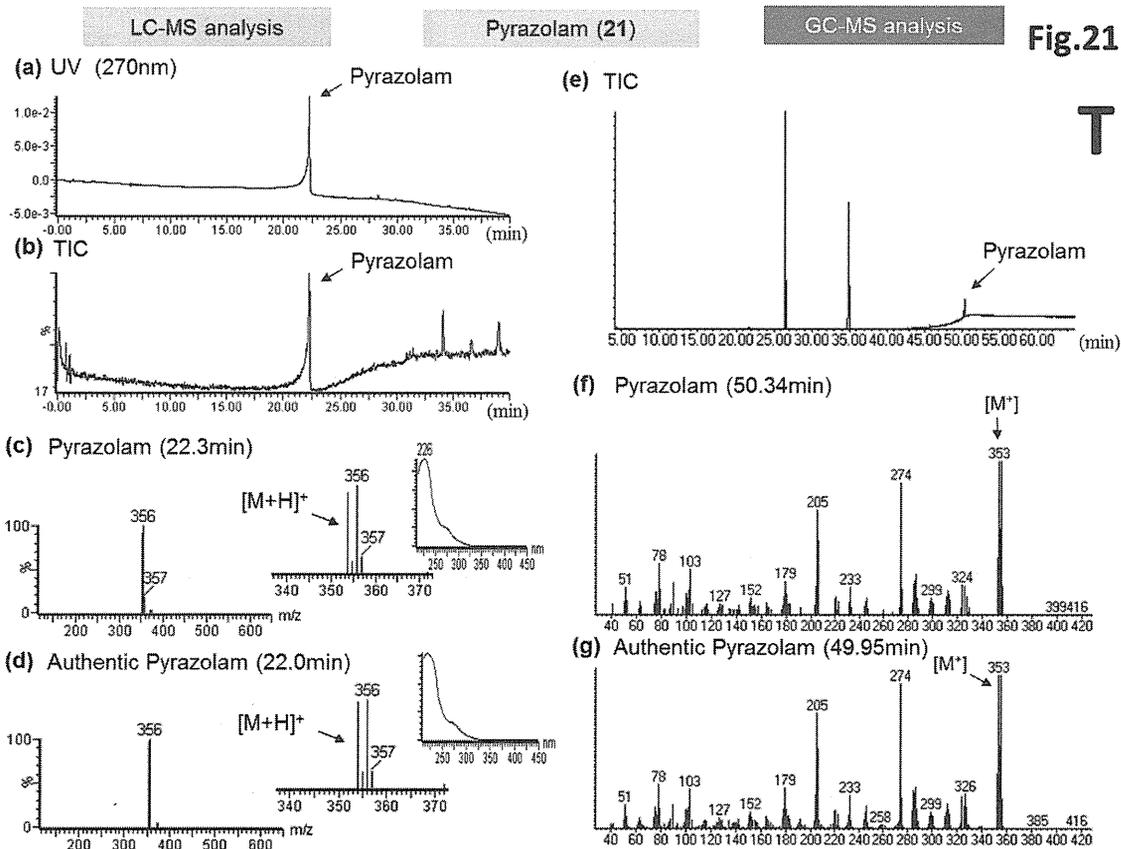


Fig. 21. LC-MS and GC-MS analyses of product T.

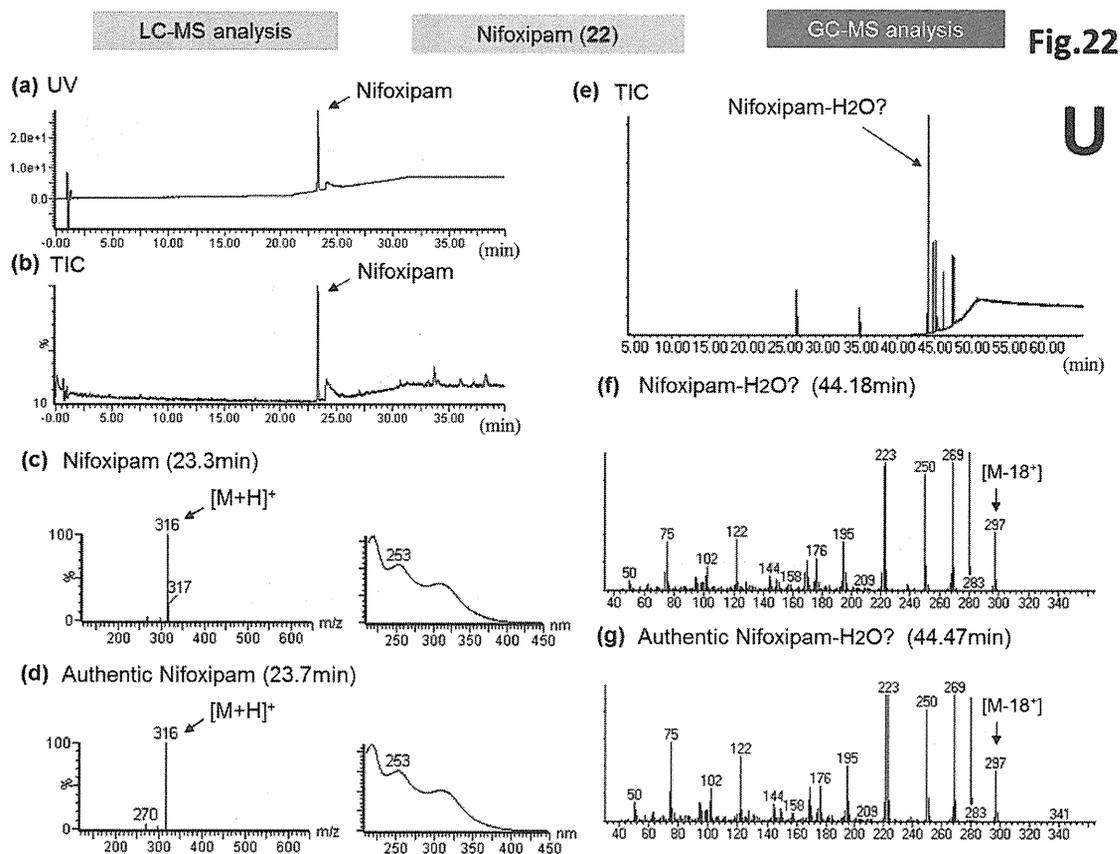


Fig. 22. LC-MS and GC-MS analyses of product U.

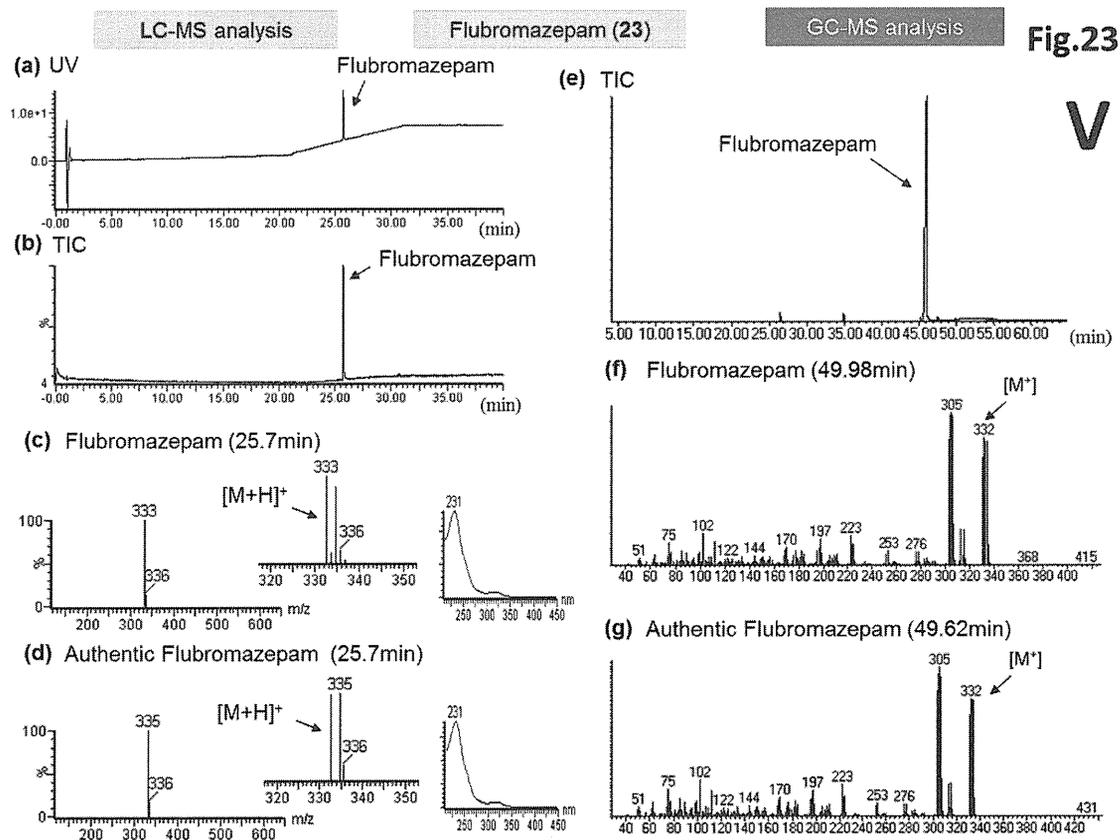


Fig. 23. LC-MS and GC-MS analyses of product V.

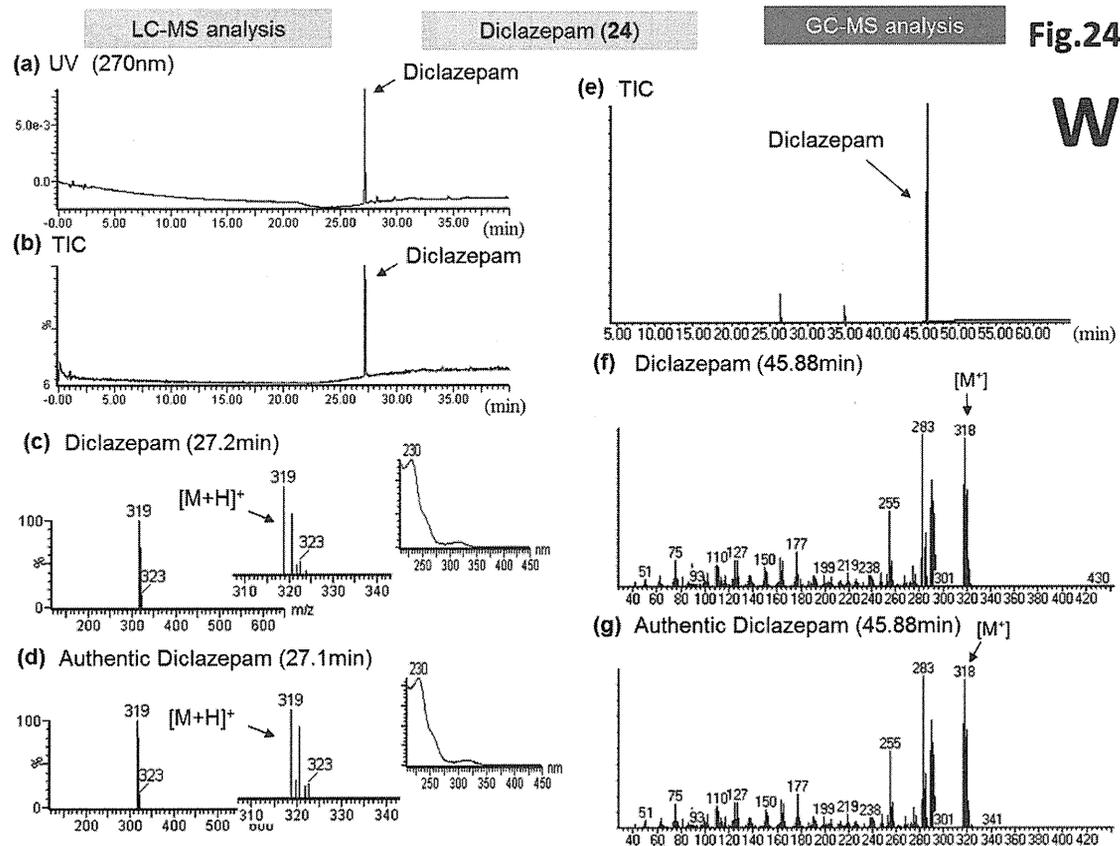


Fig. 24. LC-MS and GC-MS analyses of product W.

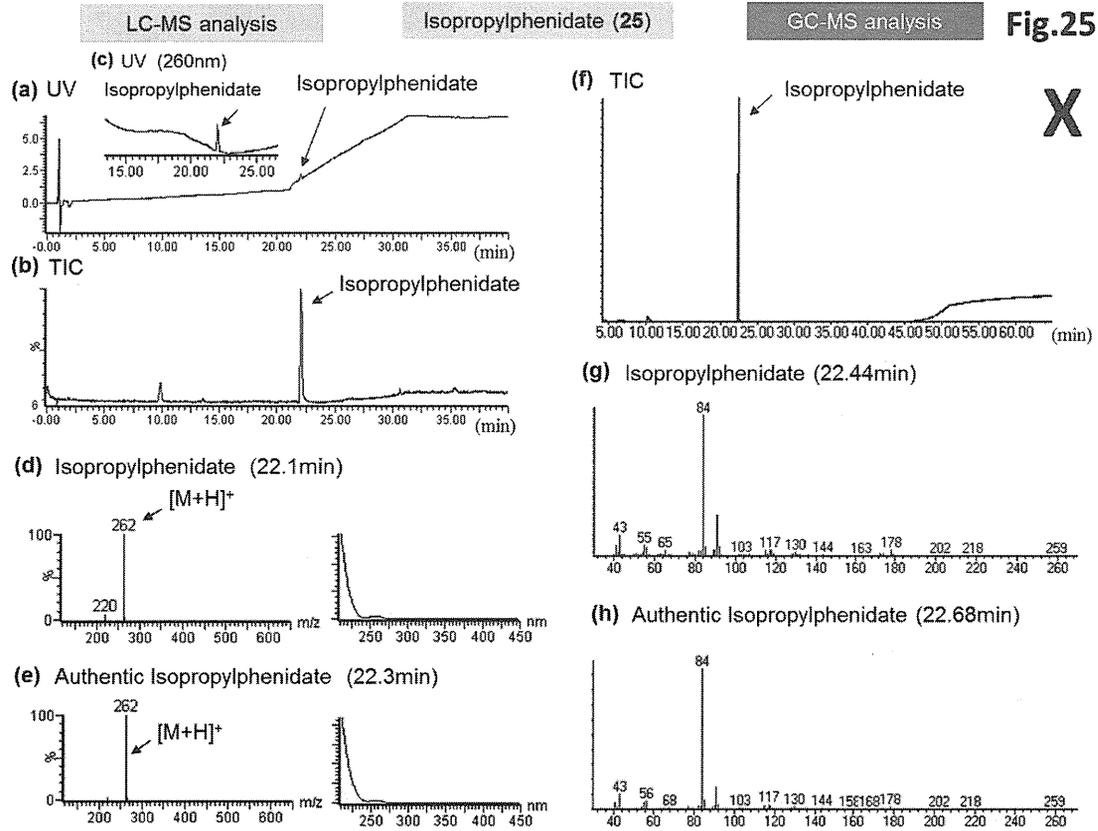


Fig. 25. LC-MS and GC-MS analyses of product X.

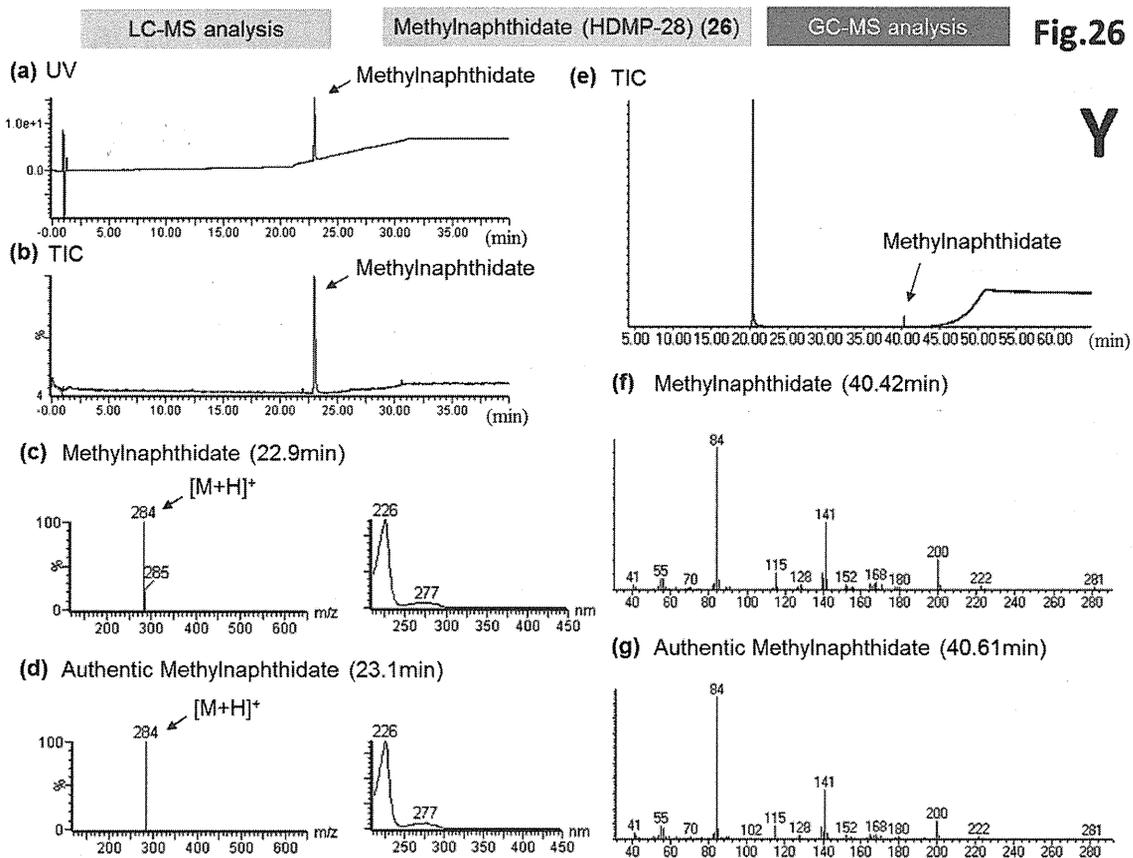


Fig. 26. LC-MS and GC-MS analyses of product Y.

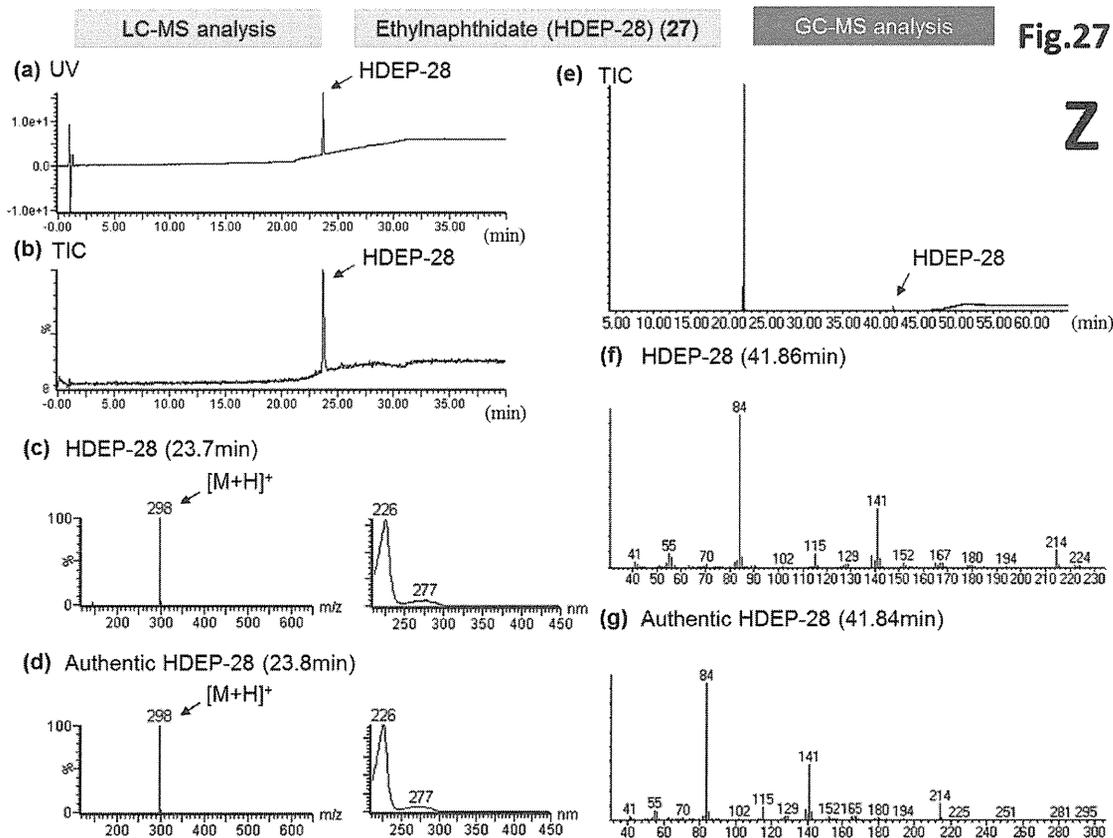


Fig. 27. LC-MS and GC-MS analyses of product Z.

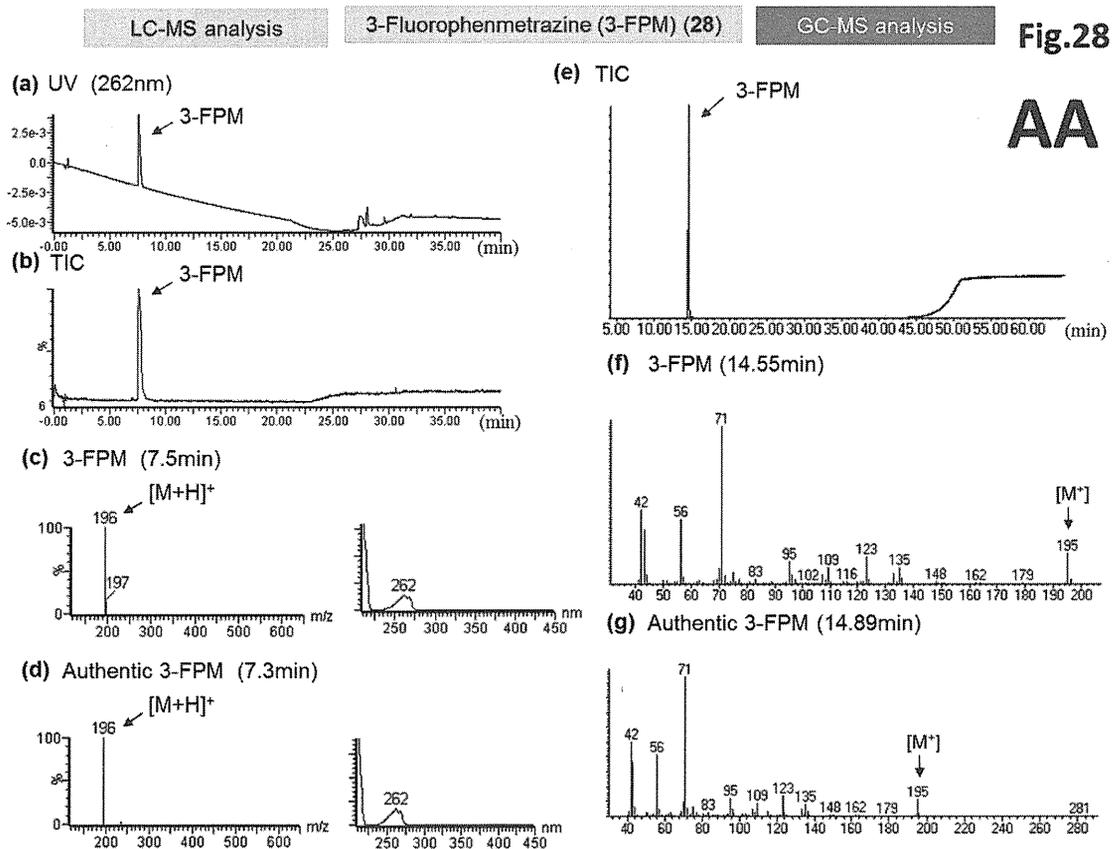


Fig. 28. LC-MS and GC-MS analyses of product AA.

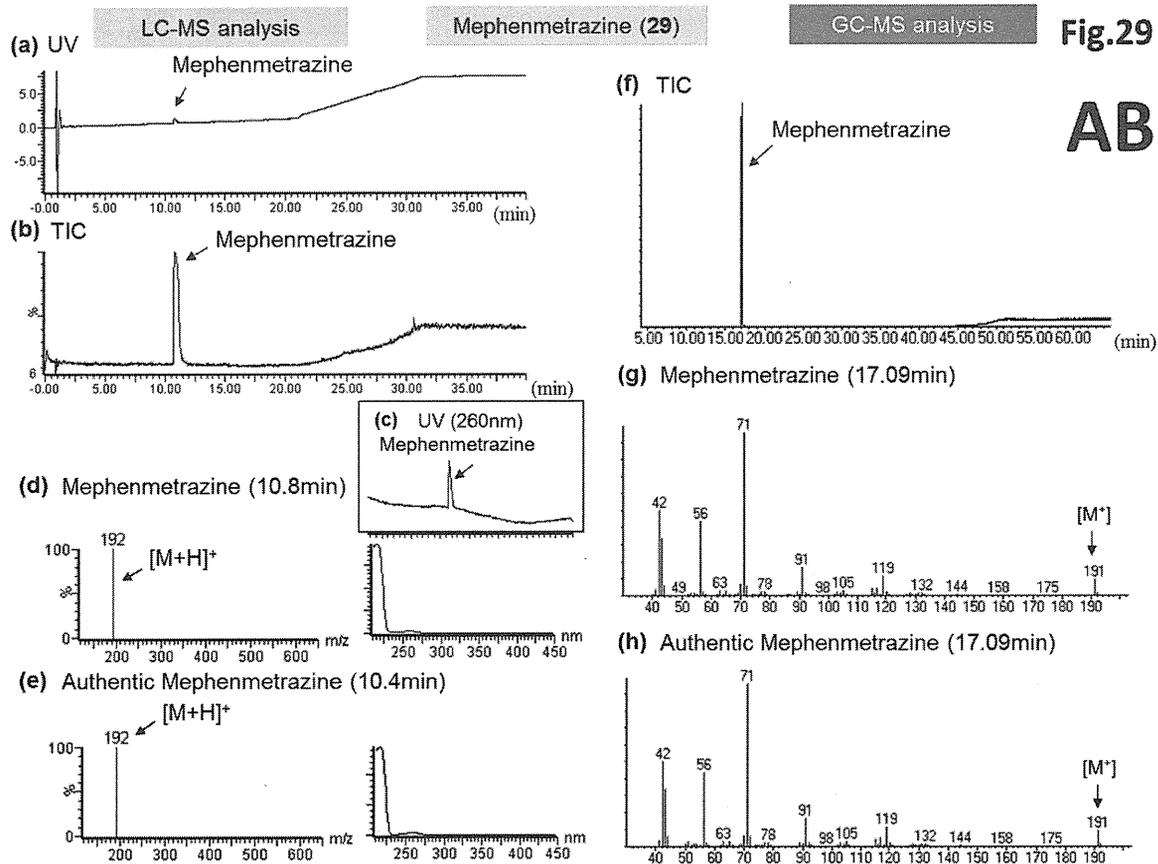


Fig. 29. LC-MS and GC-MS analyses of product AB.

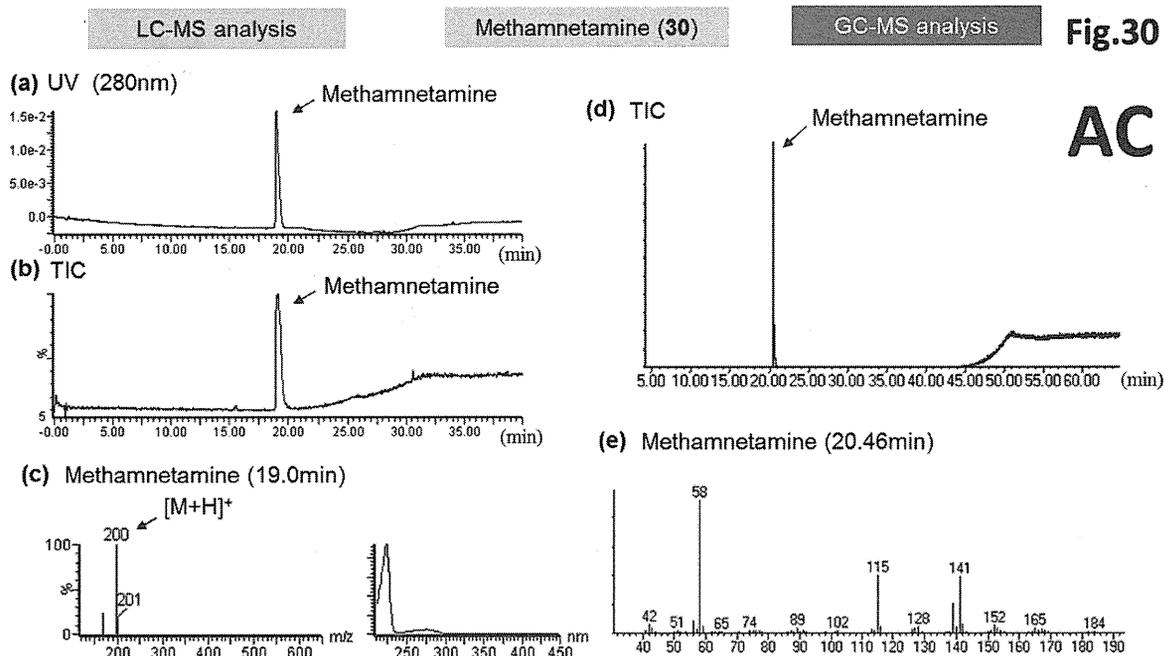


Fig. 30. LC-MS and GC-MS analyses of product AC.

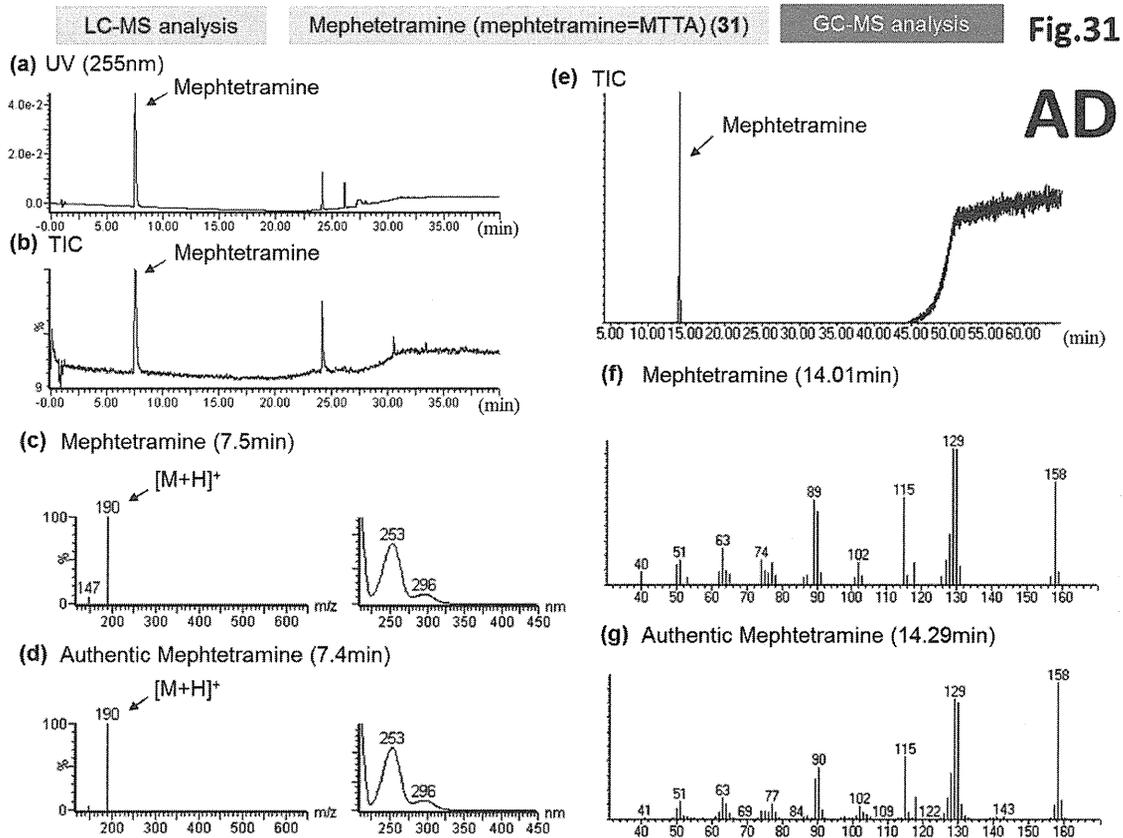


Fig. 31. LC-MS and GC-MS analyses of product AD.

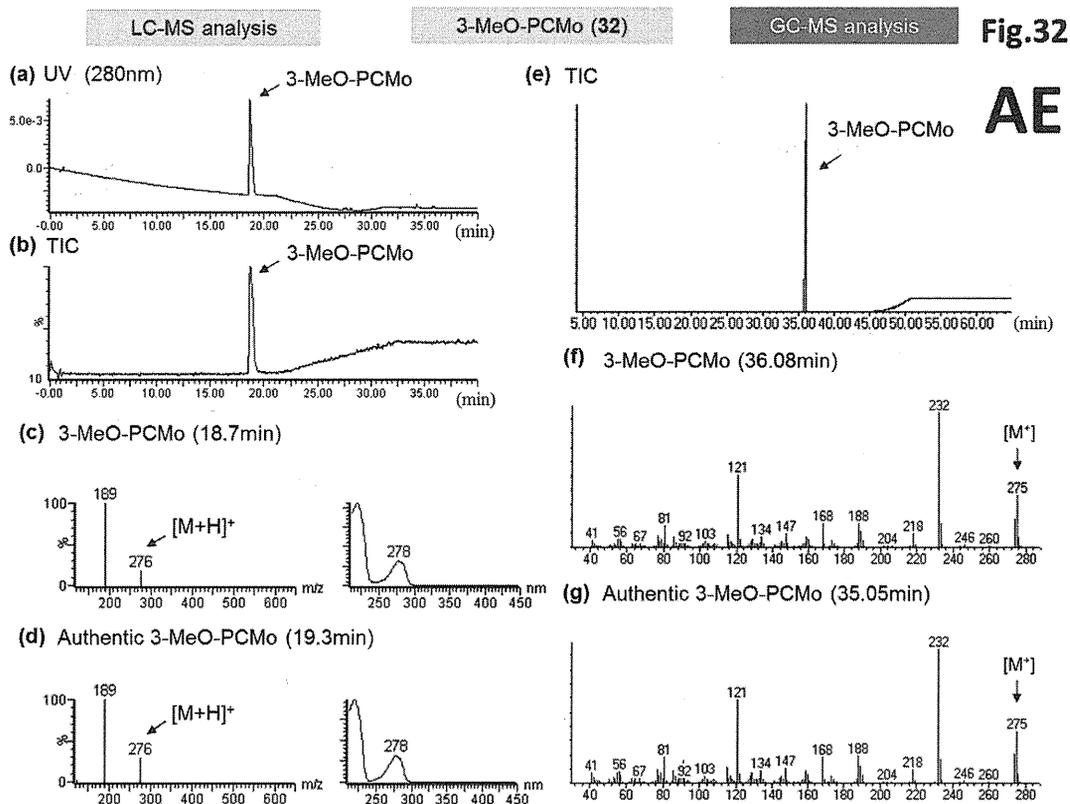


Fig. 32. LC-MS and GC-MS analyses of product AE.

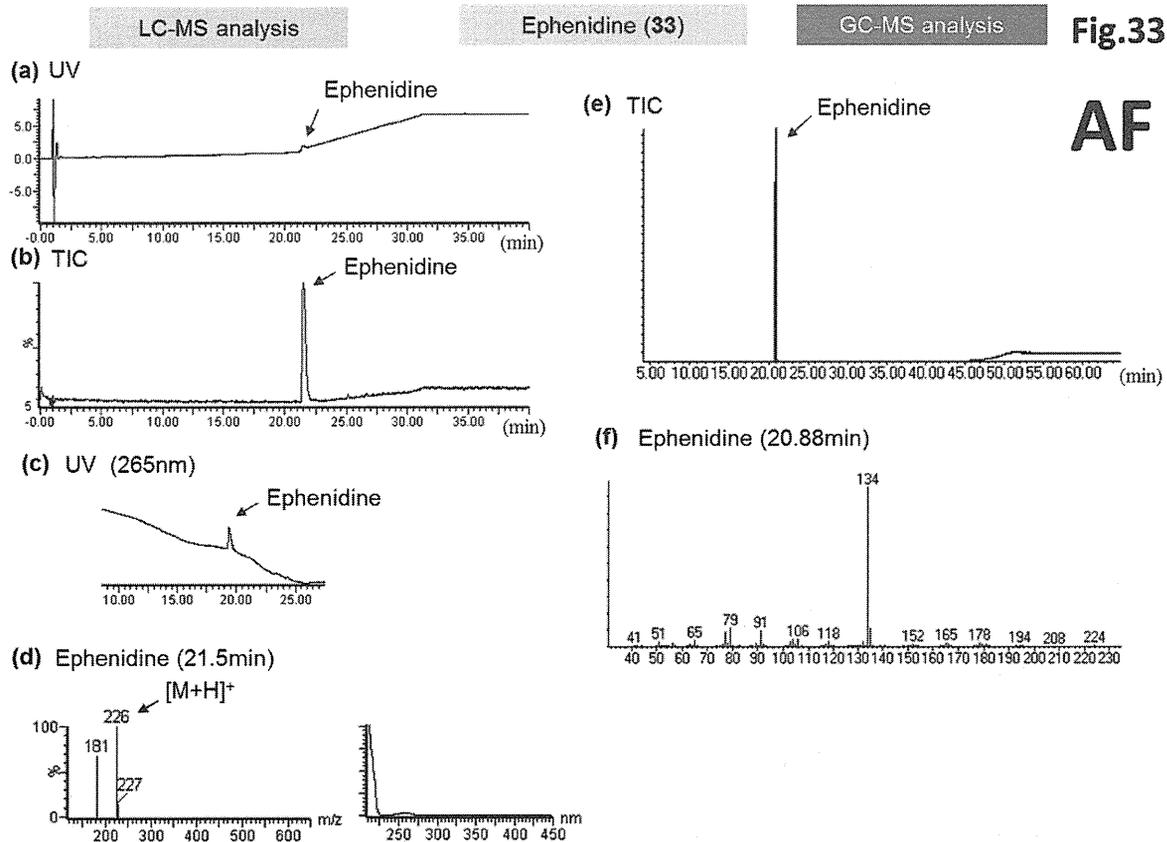


Fig. 33. LC-MS and GC-MS analyses of product AF.

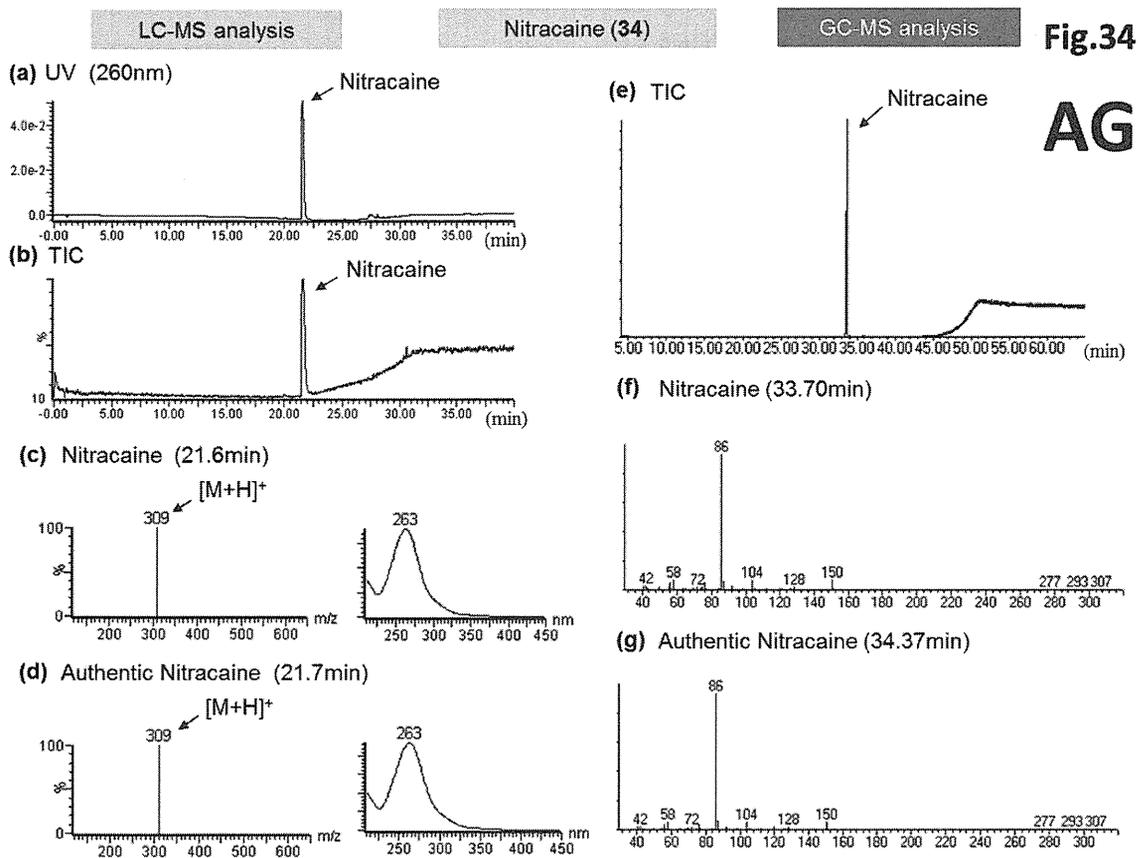


Fig. 34. LC-MS and GC-MS analyses of product AG.

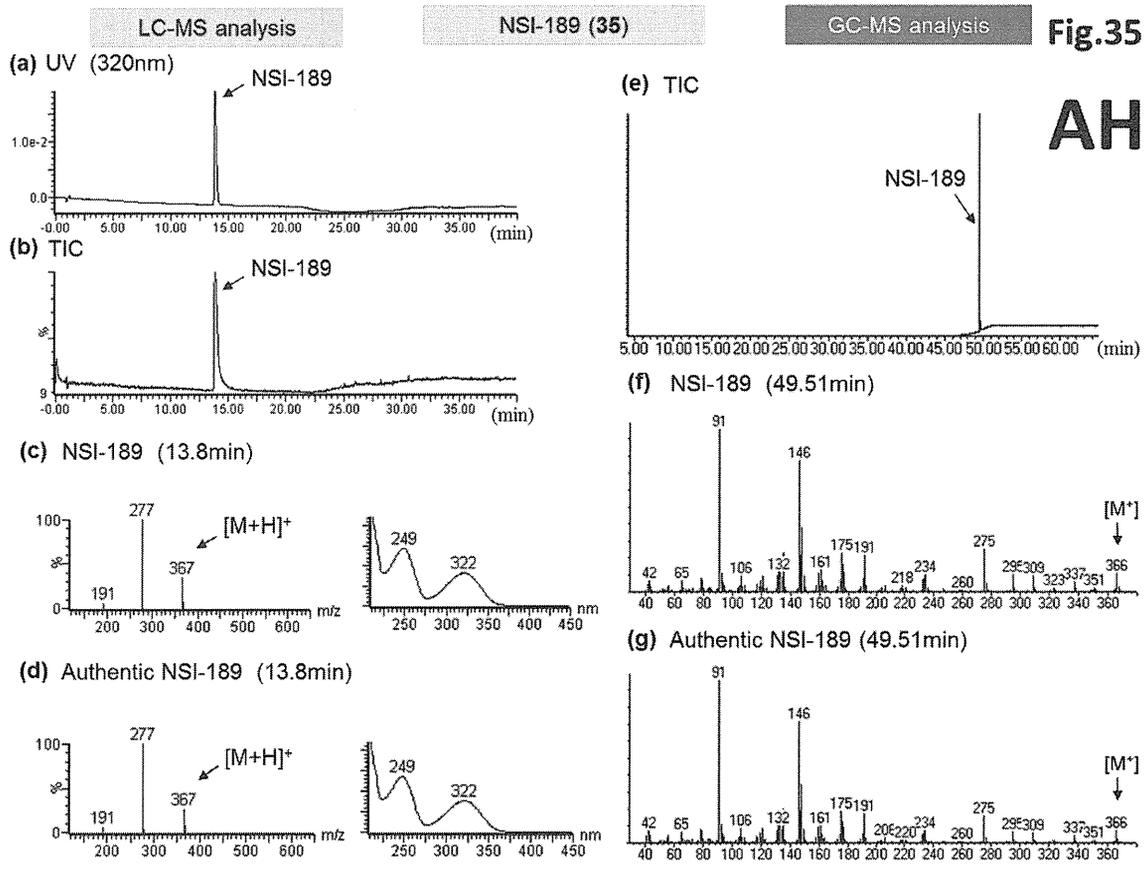


Fig. 35. LC-MS and GC-MS analyses of product AH.

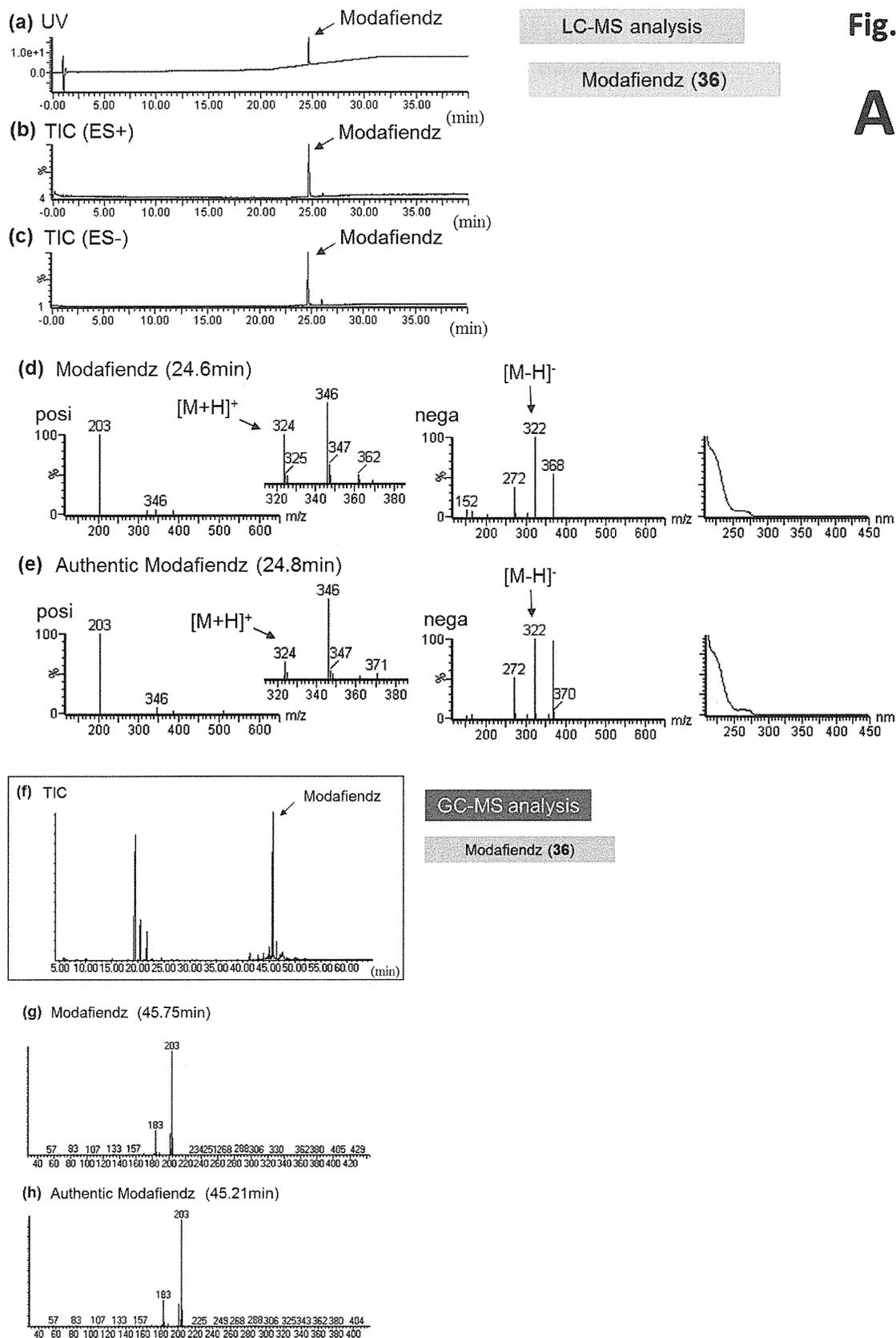


Fig.36

AI

Fig. 36. LC-MS and GC-MS analyses of product AI.

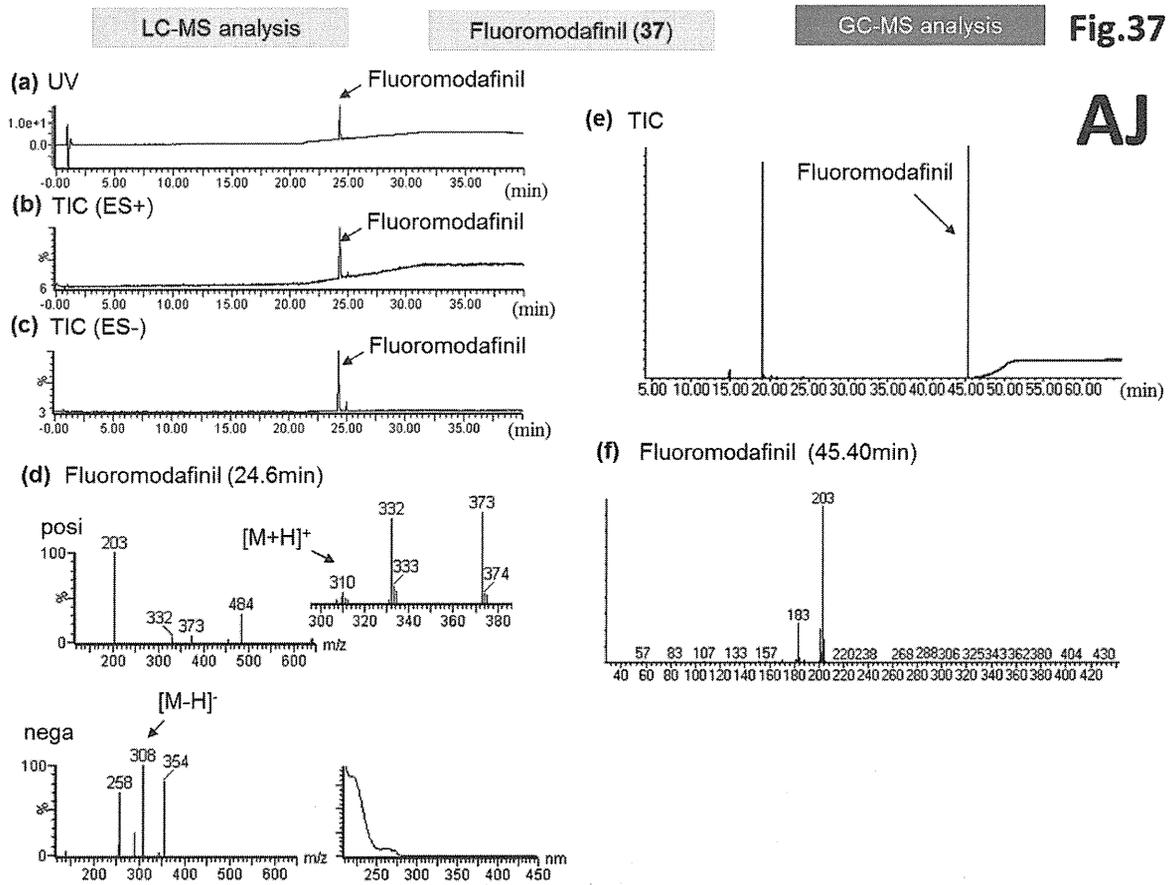
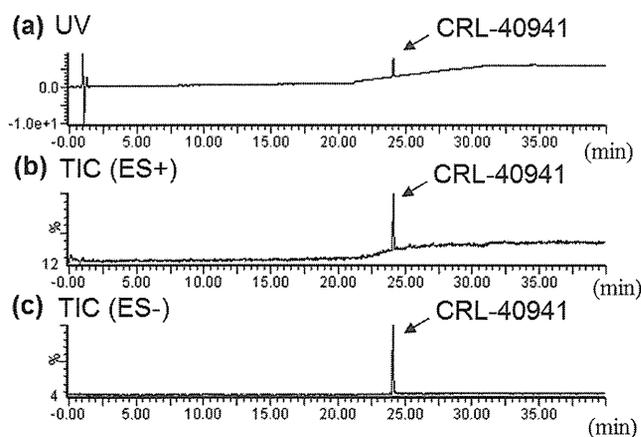


Fig. 37. LC-MS and GC-MS analyses of product AJ.



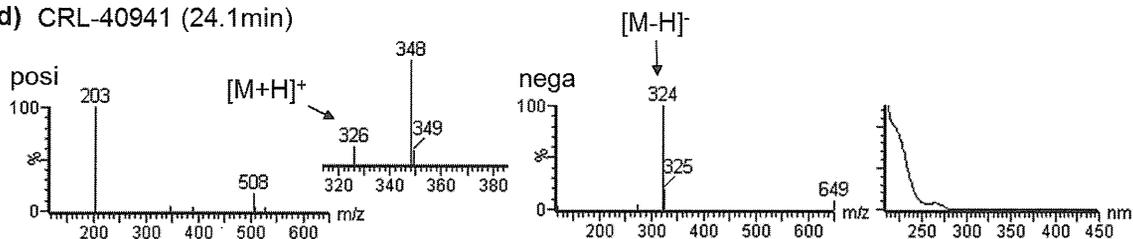
LC-MS analysis

Fig.38

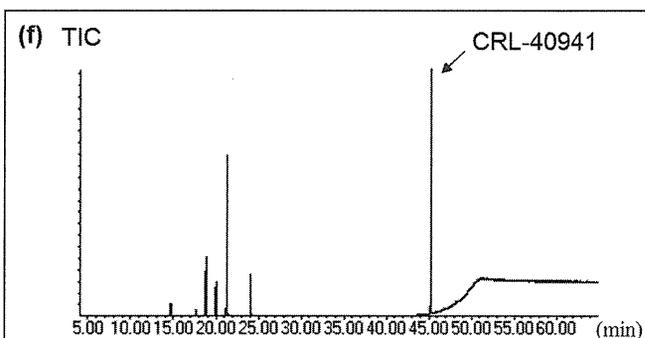
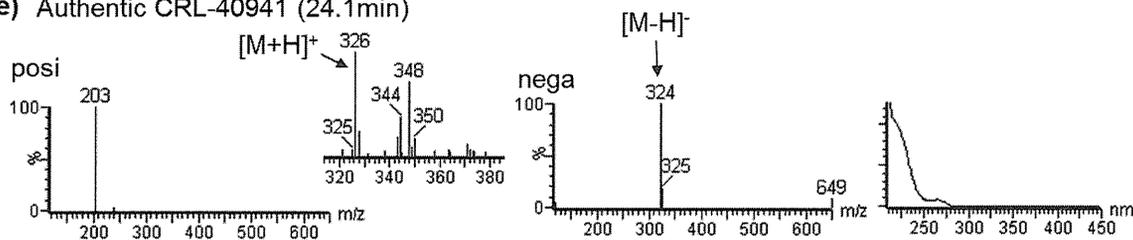
CRL-40941 (Fluorodrafinil) (38)

AK

(d) CRL-40941 (24.1min)



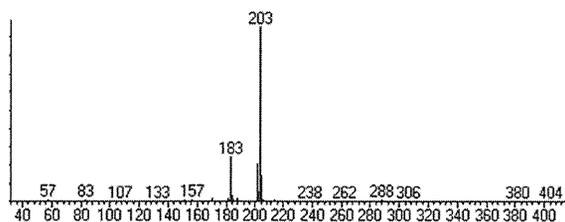
(e) Authentic CRL-40941 (24.1min)



GC-MS analysis

CRL-40941 (Fluorodrafinil) (38)

(g) CRL-40941 (45.20min)



(h) Authentic CRL-40941 (45.20min)

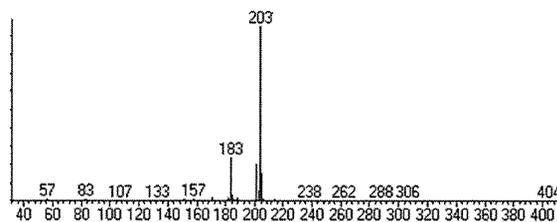


Fig. 38. LC-MS and GC-MS analyses of product AK.

分担研究課題：危険ドラッグの流通実態調査及び新規流通化合物の同定
研究分担者：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

— Δ^9 -THC と合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB, JWH-018 の投与が誘発する
マウスの脳活動の解明—

研究協力者：小早川 令子 関西医科大学附属生命医学研究所 学長特命教授

研究要旨：合成カンナビノイドの投与がどのような脳活動を誘発するのかが解明されていない。本研究では、マウスに Δ^9 -THC, 5F-ADB, JWH-018 の何れかの薬剤を投与した際に誘発される脳活動を神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の発現を指標に解析した。 Δ^9 -THC, 5F-ADB, JWH-018 はいずれも共通して扁桃体中心核、分界条床核、傍小脳脚核の *c-fos* mRNA 発現を誘導したが、5F-ADB, JWH-018 はこれらに加え、外側および内側視索前野、外側中隔核、視床下部室傍核、視床室傍核、視索上核、青斑核における強力な *c-fos* mRNA の発現も誘導した。これらの結果から、合成カンナビノイドは Δ^9 -THC とは異なり、自律神経応答や情動行動、記憶を制御する脳領域に異常な脳活動を誘発していることが明らかになった。

A. 研究目的

合成カンナビノイドの一種である 5-fluoro-ADB や JWH-018 は Δ^9 -THC と同様に、カンナビノイド受容体である CB₁ や CB₂ に結合するが、その作用薬としての活性はより強力である。合成カンナビノイドの投与は意識障害やおう吐、けいれん、錯乱などを引き起こす。また、交通事故に繋がる無謀な運転などの行動異常を誘発する場合もある。これらの異常な生理応答や行動は合成カンナビノイドの投与が誘発する異常な脳活動が原因となると推定される。しかし、合成カンナビノイドの投与がどのような脳活動を誘発するのかが解明されていない。本研究では、マウスに Δ^9 -THC, 5F-ADB, JWH-018 の何れかの薬剤を投与した際に誘発される脳活動を神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の発現を指標に解析した。異常な生理応答や行動の誘発に関与する可能性が高いと推定される脳領域に関しては、それぞれの薬剤を投与

したマウスと、薬剤の希釈溶媒を投与したコントロールマウスとの間で、*c-fos* mRNA 発現の定量的な比較解析を行った。これらの解析結果に基づいて、合成カンナビノイドの投与がどのような脳活動を誘発するのかが、合成カンナビノイドと Δ^9 -THC は異なる脳活動を誘発するのかが、5F-ADB, JWH-018 が誘発する異常な生理応答や行動は脳活動から説明できるのか、などの諸問題の解明を目指した。

B. 研究方法

Δ^9 -THC（Cerilliant 社製）は、Ethanol/emurphor® EL-620（GAF Chemical, Wayne, NJ）/生理食塩水（1/1/18）の溶媒に溶解させた。Vehicle として、上記溶媒 Ethanol/emurphor® EL-620/生理食塩水（1/1/18）を用いた。JWH-018 および 5-fluoro-ADB（Cayman chemical 社製）は、DMSO/emurphor® EL-620/生理食塩水（1/1/18）

の溶媒に溶解させた。Control (vehicle) として、上記溶媒 DMSO/emurphor® EL-620/生理食塩水 (1/1/18)を用いた。

日本 SLC から購入した約 9 週齢の雄の C57/BL6 マウスを、1 匹ずつテストケージに移し、実験環境で約 2 時間馴化を行った。馴化後、 Δ^9 -THC (10 mg/kg), 5-fluoro-ADB (5 mg/kg), JWH-018 (5 mg/kg)を腹腔内に注射した(Δ^9 -THC は n=2, 5-fluoro-ADB 及び JWH-018 は各 n=3)。また、コントロールとして Ethanol/emurphor® EL-620/生理食塩水 (1/1/18), DMSO/emurphor® EL-620/生理食塩水 (1/1/18)を腹腔内に注射した(各 n=2)。注射後 60 分後にマウスをインフルラン麻酔し、4% パラホルムアルデヒドで還流固定後、脳を摘出した。摘出した脳は 4% パラホルムアルデヒドで一晩後固定したのちに、パラフィンブロックを作成し、自動パラフィン切片作製装置 (KURABO, AS-200S)を用いて 5 μ m の切片を作成した。切片は、4枚の連続切片を 50 μ m 毎に作成し、これを全脳にわたって行った。得られた切片は自動 *in situ* Hybridization 装置 (Roche, VENTANA XT)を用いて *c-fos* mRNA の発現を検出した。得られた切片は自動封入機 (Sakura Finetek, Tissue-Tek® Glass™)を用いて封入し、バーチャルスライドスキャナー (Hamamatsu Photonics, NanoZoomer 2.0)を用いて染色画像を取得した。

c-fos mRNA 発現量の定量は、バーチャルスライドスキャナーで得られた染色像を画像解析ソフト (Adobe, Photoshop)を用いて白黒画像に変換後、扁桃体中心核 (CeA), 室傍核 (PVN), 視索上核 (SO)のそれぞれの領域に存在するシグナルの平均値を計測した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、関西医科大学の「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. 結果

合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB と JWH-018

が誘発する全脳領域の神経活動を解明するために、神経活動マーカーである *c-fos* mRNA の発現を指標に用いた全脳活性化マッピング解析を実施した。5-fluoro-ADB と JWH-018 は多くの脳領域で *c-fos* mRNA の発現を誘発した。また、両者の薬剤の *c-fos* mRNA の発現誘導のパターンには類似性が高く、いずれか一方の薬剤の投与によってのみ *c-fos* mRNA の発現誘導が観察される領域を見つけることはできなかった。合成カンナビノイドの投与によって *c-fos* mRNA の発現が誘発される領域を Table 1 にまとめた。これらの中で特に強力な *c-fos* mRNA の誘発が観察された脳領域には、Lateral septal nucleus (LS:中隔外側核), bed nucleus of stria terminalis (BST:分界条床核), Lateral & medial preoptic area (LPO&MPO:外側と内側視索前野), paraventricular nucleus of thalamus (PVT:視床室傍核), paraventricular nucleus of hypothalamus (PVH:視床下部室傍核), supraoptic nucleus (SO:視索上核), central amygdala (扁桃体中心核:CeA), parabrachial nucleus (PB:傍小脳脚核), locus coeruleus (LC:青斑核)が挙げられる(Figure 1A)。これらの領域は自律神経応答や情動の制御に関与しているという共通性が認められることから、合成カンナビノイドの投与は異常な自律神経応答や情動行動を誘発する可能性があるかと推察される。

次に、合成カンナビノイドと Δ^9 -THC のそれぞれの投与によって神経活動が誘発される脳領域を比較解析した(Table 1 参照)。 Δ^9 -THC に比較して合成カンナビノイドの投与はより多くの脳領域における *c-fos* mRNA の発現、即ち、脳活動を誘導していることが明らかになった。このことから、合成カンナビノイドの投与は Δ^9 -THC の投与に比較してより強力に生理応答や行動を誘発していると推定される。合成カンナビノイドの投与によって *c-fos* mRNA の発現が上昇するが、 Δ^9 -THC の投与では *c-fos* mRNA の発現が上昇しない脳領域を Figure 1B にまとめた。また、合成カンナビノイドと Δ^9 -THC の双方の薬剤によって共通して *c-fos* mRNA の発

現が上昇する領域を Figure 1C にまとめた。 Δ^9 -THC の投与で *c-fos* mRNA の発現が上昇するが、合成カンナビノイドの投与では *c-fos* mRNA の発現が上昇しない脳領域は今回の解析では発見できなかった。合成カンナビノイドと Δ^9 -THC による作用を区別できる脳領域として、CeA(扁桃体中心核), PVH(視床下部室傍核), SO(視索上核)の3領域を選択し、これらの領域における *c-fos* mRNA の発現誘導を定量的に解析した(Figure 2)。コントロールの溶媒のみを投与した条件と比較すると、 Δ^9 -THC と合成カンナビノイドのいずれを投与した条件でも CeA における *c-fos* mRNA の発現が有意に上昇した(Figure 2A)。これに対して、PVN や SO では合成カンナビノイドを投与した条件においてのみ *c-fos* mRNA の発現が有意に上昇した(Figure 2B,C)。従って、SO や PVH における *c-fos* mRNA の発現を指標にすることで Δ^9 -THC と合成カンナビノイドを区別することができ、また、CeA の *c-fos* mRNA の発現を指標にすることで Δ^9 -THC と合成カンナビノイドの共通性を評価することができる。

D. 考察

全脳活性化マッピング実験の結果から、本研究で使用した2種類の合成カンナビノイドの投与は Δ^9 -THC の投与に比較してより多くの脳領域においてより強力な神経活動を誘発していることが示唆された。この異常な脳活動を多発するという性質が、合成カンナビノイドの摂取者に見られる意識障害、けいれん、錯乱などを引き起こす原因になっている可能性が考えられる。もし、この可能性が正しいのであればマウスの全脳領域をどの程度活性化するかという性質を指標にして薬物がヒトに誘発する異常のレベルを類推できる可能性がある。ここで観察された脳活動の上昇がどのような受容体により誘発されているのかは不明である。 Δ^9 -THC は CB1, CB2 以外に TRPA1 に結合することが報告されている。これらの受容体のノックアウトマウスを対象にした全脳活性化マッピングを実

施することで、どの受容体が脳活動の上昇に関与するのかを解明できる。

機能未知の合成カンナビノイドを被験者に摂取させその脳活動を計測する研究を実施することは困難である。このため、マウスをモデルとして脳活動を計測することは意味がある。しかし、合成カンナビノイドが誘発する脳活動にヒトとマウスの間でどの程度相同性があるのかは不明である。この問題の答えに近づくためには、どのような分子メカニズムで合成カンナビノイドが脳活動を誘発しているのかを解明することがヒントになる。この点において受容体遺伝子のノックアウトマウスの解析は意義がある。ただし、カンナビノイド受容体の薬剤に対する親和性はヒトとマウスとの間で相違があると考えられる点にも注意する必要がある。CB1, CB2, TRPA1 の各遺伝子をヒトの配列に置換した「ヒト型カンナビノイド受容体マウス」を開発すれば、少なくとも受容体レベルではヒトの性質を持つモデル動物を用いた研究が可能になる。これらの「ヒト型カンナビノイド受容体マウス」において合成カンナビノイドがどのような脳活動を誘発するのかを解析することで、合成カンナビノイドのヒトに対する影響がこれまででない精度で推定できると考えられる。

本研究により、合成カンナビノイドの投与は自律神経応答や情動行動の制御に関与する複数の脳領域において *c-fos* mRNA の発現を誘導するという特徴を持つことが判明した。これらの領域には、体温の制御に関与することが知られている視床下部の MPO, LPO, DMH, VMH が含まれる。従って、合成カンナビノイドを投与したマウスでは体温に何らかの異常が発生していると推定される。この可能性は、合成カンナビノイドを投与したマウスの体表面温度をサーモグラフィーで計測する方法や、体深部温度を埋め込み式体温計を用いて計測するなどの方法で確認できる。また、合成カンナビノイドを摂取したヒトにおいても体温の異常が誘発されている可能性がある。体温は比較的容易に測定することができるので、合成カンナビノ

イドの薬効を推定する指標の一つとして活用することができるかもしれない。

なお、本研究では合成カンナビノイドが誘発する強力な生理作用の原因を探ることを目的としているために、 Δ^9 -THC と合成カンナビノイドの間で見られる誘発脳活動の差異に着目した議論を主に展開した。しかし、全脳活性化マッピングにより解明された Δ^9 -THC が誘発する脳活動にも科学的に興味深い点が幾つかある。ここではその一つに関して簡単に議論する。 Δ^9 -THC は合成カンナビノイドと共通して脳の扁桃体中心核を強力に活性化した。私たちが最近 *Cell* 誌に報告した論文では先天的な恐怖情動を誘発する匂い分子も同様に扁桃体中心核を活性化するが、この活性化は後天的な恐怖記憶の強力な抑制効果を持つことが明らかになっている。このことから、 Δ^9 -THC や合成カンナビノイドの投与は恐怖記憶の抑制、あるいは、もっと一般的な記憶障害を誘発している可能性が推定される。例えば、合成カンナビノイドを摂取したヒトでは短期的あるいはより長期的に記憶の障害が発生している可能性があり、もし、そうであれば合成カンナビノイドを摂取したこと、あるいはそれによって引き起こされた出来事に関する記憶の形成自体ができていない可能性が考えられる。 Δ^9 -THC や合成カンナビノイドが扁桃体中心核のどの種類の細胞を活性化しているのかを解明することでこの可能性を検証することができる。また、 Δ^9 -THC は PTSD 患者の症状を緩和する効果を持つことが明らかになってきている。もし、5-fluoro-ADB や JWH-018 などとは異なり視床下部などの自律神経制御システムに影響を与えずに、扁桃体中心核を特異的に活性化する合成カンナビノイドを発見することができれば、PTSD の有望な治療薬として活用できることが期待できる。

E. 結論

合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB と JWH-018 の投与は自律神経応答や情動行動の制御に関与する脳領域を強力に活性化する。この効果は、

Δ^9 -THC の投与に比較して明らかに強力である。このことは、合成カンナビノイドの摂取が誘発する異常な生理応答や行動の原因となる可能性がある。全脳活性化マッピングによるスクリーニングを指標にすることで、合成カンナビノイド 5-fluoro-ADB, JWH-018 と Δ^9 -THC の効果を識別できる。

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。