

令和5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)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

課題番号：22KC1005

総括研究報告書

分担研究報告書

令和6(2024)年3月

研究代表者：鈴木 勉

目次

令和5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: 22KC1005)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

I.	令和5年度 総括研究報告書	-----1
	鈴木 勉 (湘南医療大学 薬学部)	
II.	令和5年度 分担研究報告書	
研究-1 :	幻覚発現物質の評価検証を目指した試験法の開発	-----27
	鈴木 勉 (湘南医療大学 薬学部)	
研究-2 :	危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究	-----40
	船田正彦 (湘南医療大学 薬学部)	
研究-3 :	幻覚作用を有する薬物の合成	-----50
	栗原正明 (湘南医療大学 薬学部)	
研究-4 :	摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価	-----55
	森 友久 (星薬科大学 薬学部)	
研究-5 :	幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・モノアミン代謝回転について	
	北中純一 (兵庫医科大学 薬学部)	-----63
研究-6 :	危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究	-----70
	増川太輝 (横浜市立大学 医学部)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----80

令和5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：22KC1005)

総括研究報告書

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

研究代表者 鈴木 勉

(湘南医療大学 薬学部)

【研究要旨】

指定薬物は中枢神経系に作用して、興奮若しくは、抑制又は幻覚作用を発現する薬物に分類される。次々と市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制するためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発が望まれる。そこで本研究では、幻覚発現薬と作用機序が類似する κ -オピオイド受容体作動薬および 5-HT₂ 受容体作動薬を使用しマウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験を実施した。さらに、幻覚作用の指標として使用されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。加えて、幻覚作用を有すると考えられる κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI の合成を行った。様々なタイプの幻覚誘発薬によって引き起こされる行動変化を評価しうる実験系の構築を目指すため、構造変換が容易な phenylpiperadine 誘導体に着目し、解析法についても検討した。幻覚作用を有する DOI によって引き起こされるマウス異常行動を検討した。5-HT_{2A} 受容体とドーパ/GPR143 シグナルとの関連性を明らかにするため、GPR143 欠損マウスを用いて、5-HT_{2A} 受容体作動薬である DOI の薬理作用を野生型と比較・検討した。幻覚作用の客観的評価が困難な要因として、定量化・数値化が難しいことが挙げられる。本研究では、幻覚発現薬と考えられる薬物が条件づけ場所嗜好性試験において嫌悪効果を示した。この嫌悪効果は5日間という比較的短期間で評価可能であり、幻覚発現を定量化・数値化できると考えられた。さらに、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。弁別刺激効果による蓋然性評価と比べ、自発運動促進効果による評価は非常に簡便でスクリーニングにも非常に有用と考えられた。ICR系マウスにおける幻覚発現薬による異常行動は、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度の間に関係が認められた。加えて、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を抑制することを明らかにし、ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離測定系を確立した。これらの研究結果を基に指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究を遂行していく。

[研究-1：幻覚発現物質の評価検証を目指した試験法の開発]

乱用目的に次々と合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発が望まれる。また、幻覚作用の客観的評価として、定量化・数値化する必要がある。本研究では、幻覚発現薬と作用機序が類似する κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用しマウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験を実施した。さらに、幻覚発現薬による幻覚発現時には情動異常を引き起こす可能性が考えられるため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。条件づけ場所嗜好性試験においては、 κ -オピオイド受容体および 5-HT₂ 受容体作動薬で嫌悪効果を認めた。この嫌悪効果は、おそらく幻覚発現薬の幻覚作用に起因していると考えられる。したがって、本試験を用いることで嫌悪作用を指標とした幻覚発現薬の幻覚作用を評価可能であると考えられる。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ -オピオイド受容体作動薬および 5-HT₂ 受容体作動薬で情動異常を検出できた。本試験を用いることで、幻覚発現薬の幻覚発現に伴う情動異常が評価可能であると考えられる。

[研究-2：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究]

未規制の乱用薬物である危険ドラッグには、幻覚作用を示す薬物が存在する。幻覚作用の評価方法は確立しておらず、法規制のためには正確に幻覚作用の評価を行うシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示唆されている。セロトニン受容体作用を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。HTR を定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。マグネットメーターは、ポリウレタン銅線を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。実験には、ICR 系マウスを使用した。マウスの頭蓋表面に強力な磁力を有するマグネットをデンタルセメントで留置して、装置内での HTR の動きで感知される電気信号を測定した。装置上部より、ビデオ撮影を行い、行動変化と電気信号の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。幻覚を誘発する薬物として、セロトニン 5-HT₂ 受容体作用薬の 4-Iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI)および選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体作用薬である 4-Bromo-3,6-dimethoxybenzo cyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide (TCB-2)を使用した。DOI および TCB-2 投与後、HTR の特異的なシグナルの検出を行った。DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。DOI による HTR

は選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬の(R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1- (R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperinemethanol (MDL100907)により完全に抑制された。以上の結果から、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。セロトニン受容体作用薬によるマウスの首振り反応の発現には、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。本解析手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

【研究-3：幻覚作用を有する薬物の合成】

幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。セロトニン受容体に作用する化合物 U50,488 の合成を行った。7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、トータル収率約 20%で U50,488 を合成することができた。次に光学活性体の合成を行いたい。

【研究-4：摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価】

乱用が問題となる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚を有し、自発運動を強く亢進させるとされてきた。そのため乱用に関する蓋然性評価において、精神刺激薬様の摂取感覚あるいは自発運動促進効果が蓋然性評価の指標とされてきた。しかしながら我々の近年の研究では、いくつかの幻覚を発現するカチノン系薬物ではこうした相関が認められず、これらの結果は、指定薬物の指定に係る試験法として、少なくとも1つの指標による評価では、十分な評価が難しいことを示唆している。本分担研究課題では、様々なタイプの幻覚誘発薬によって引き起こされる行動変化を評価しうる系の構築を目指すため、本年度は、構造変換が容易な phenylpiperadine 誘導体に着目し、解析法について検討することとした。そこで、1-(3-trifluoromethylphenyl)piperadine(TFMPP)、1-(3-chlorophenyl)-piperadine (3-CPP) および phenylpiperadine による MDMA の弁別刺激効果に対する般化試験、さらにこれらの自発運動に及ぼす影響を検討した。その結果、phenylpiperadine および 3-CPP は MDMA 様の弁別刺激効果を示したものの、TFMPP は般化しかなかった。一方、自発運動の測定において、TFMPP は運動亢進を示したものの、phenylpiperadine および 3-CPP は自発運動に影響を及ぼさなかった。このように phenylpiperadine 構造を有する薬物においても精神刺激薬様の摂取感覚を持つにも関わらず、自発運動に影響を及ぼさない薬物が確認され、蓋然性評価系において、少なくともいくつかの評価系の組み合わせることが重要であると確認された。今後は、乱用が懸念される NMDA-遮断薬および κ -受容体作動薬の乱用予測のための評価系について検討していくこととし、現在、弁別刺激効果ならびに自発運動の測定に着手している。

[研究-5：幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・モノアミン代謝回転について]

幻覚作用を有する 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI)によって引き起こされるマウス異常行動（前肢洗顔行動・後肢引っ掻き行動・伏臥位・首振り行動）のうち、首振り行動以外は DOI の用量依存的に発現頻度が増加した。前肢洗顔行動（投与後 0-20 分）と伏臥位（投与後 20-60 分）発現頻度との間には正の相関関係 ($R^2=0.6197$) が認められた。DOI 投与によって、新奇物体への関心やガラス玉埋め行動の減少傾向が認められたが、水平方向の総運動量は変化しなかった。DOI 誘導異常行動と大脳皮質・線条体および側坐核・海馬各部位におけるモノアミン代謝回転との間に相関は認められなかった。

[研究-6：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究]

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、従来、アミノ酸脱炭酸酵素によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。我々は、ドーパの遊離が、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって増加するのに対して、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制させること、ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化が、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルによって抑制されることを見出してきた。これらのことは、ドーパが精神症状の一部に関与することを示す。本研究においては、ドーパの遊離、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。セロトニン 2A 受容体とドーパ/GPR143 シグナルとの関連性を明らかにするため、GPR143 欠損マウスを用いて、セロトニン 2A 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) の薬理作用を野生型と比較・検討した。結果、GPR143 欠損マウスにおいて野生型と比較し、DOI による運動量増加作用および側坐核における c-Fos 発現増加作用が増強した。次に、マイクロダイアリシスを用いて、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定を試みたところ、側坐核におけるこれらの神経伝達物質検出が可能となった。さらに、セロトニン 2A 受容体発現 CHO 細胞に DOI を処置すると、ERK リン酸化レベルが上昇し、DOI の効果は GPR143 の共発現により増強した。これらの結果は、GPR143 がセロトニン 2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

結論：

本研究では指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に取り組み、初年度に以下のような成果を得ることができた。幻覚発現物質の評価検証を目指した試験法の開発では、以下の結論が導かれた。幻覚作用の客観的評価が困難な要因として、定量化・数値化が難しいことが考えられる。本研究では、幻覚発現薬と考えられる薬物において条件づけ場所嗜好性試験で嫌悪効果を認めた。この嫌悪効果は幻覚発現を比較的短期間となる計 5 日間で評価可能であり、かつ定量化・数値化

できると考えられた。さらに、ガラス玉覆い隠し試験で情動異常を認めた。この情動異常は幻覚発現を定量化・数値化していると考えられた。これまでの研究成果も踏まえつつ、幻覚を評価するための現行法の改良や新たな簡便で効率的な評価法の確立に向けて研究を進めていきたい。危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究では、以下の結論が導かれた。本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。幻覚作用を有する薬物の合成では、以下の結論が導かれた。7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、6段階でトータル収率約20%でU50,488を合成した。合成したU50,488は塩酸塩として、評価を行う各分担研究者に供した。今後も、幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行う。摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価では、以下の結論が導かれた。弁別刺激効果による蓋然性評価と比べ、自発運動促進効果による評価は非常に簡便でスクリーニング的にも非常に有用と考えられてきた。しかしながら、蓋然性評価において、乱用の危険性があるものの、運動の活性化作用を有さない薬物が多数存在するために自発運動に頼った評価では、多くの偽陰性が懸念される。弁別刺激効果においては、その選択性の高さから訓練薬物と機序が異なる場合には、類似性を示さないことが十分に想定される。乱用が予測される新規化合物の蓋然性評価において、こうした各評価系の特徴を考えた上でも、評価する構造に特異的な行動変化を評価出来る評価系をいくつか構築し、これらを使用して包括的に評価する必要があると考えられる。幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・モノアミン代謝回転については、以下の結論が導かれた。幻覚剤による異常行動は、ICR系マウスを実験系とした場合、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度とが、用量依存性、発現強度の相関性の観点から有効な観察基準と考えられた。それらの異常行動と、DOIによる環境変化への関心低下との間の関係について、今後、学習・短期空間記憶（Morris 水迷路試験）と行動変化との関連を調べる（行動評価方法の検証）。また DOI 用量反応性に行動相関が認められる前肢洗顔行動および伏臥位を制御するメカニズム（5-HT₂受容体系、opioid受容体系、視床下部ヒスタミン系等）を明らかにして、情報伝達物質の量的変動から幻覚剤の評価が可能か検証したい。危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究では、以下の結論が導かれた。本研究では、① GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を抑制することを明らかにし、②ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離測定系を確立した。ドーパ測定系が指定薬物の評価に有効であるかを検討する必要がある。

研究代表者：鈴木 勉
湘南医療大学 薬学部 教授

分担研究者：船田 正彦
湘南医療大学 薬学部 教授

分担研究者：栗原 正明
湘南医療大学 薬学部 教授

分担研究者：森 友久
星薬科大学 薬学部 教授

分担研究者：北中 純一
兵庫医科大学 薬学部 准教授

分担研究者：増川 太輝
横浜市立大学 医学部 助教

A. 研究目的

指定薬物は中枢神経系に作用して、興奮若しくは、抑制又は幻覚作用を発現する薬物に分類される。これらを指定薬物として指定するにあたり、薬物による中枢興奮作用や抑制作用については自発運動量、脳内アミン量の変化、受容体結合実験などの結果から指定が行われているが、幻覚作用の評価は非常に困難である。これまでに幻覚作用を発現することが知られている 5-HT_{2A} 受容体アゴニストなどは、マウスにおいて首振り反応 Head Twitch Response (HTR) を誘発することが明らかにされている。また、薬物を摂取した時の感覚効果の評価する方法である薬物弁別

法では幻覚作用を発現することが知られている 3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン(MDMA) の弁別刺激効果に対して 5-HT_{2A} 受容体アゴニストの 2,5-ジメトキシ-4-ヨードアンフェタミン(DOI) が般化することから類似した感覚効果を示すことが明らかにされている。さらに、 κ -オピオイド受容体アゴニストであるサルビノリン A は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている。 κ -オピオイド受容体アゴニストは、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す。加えて、NMDA 受容体拮抗薬のフェンサイクリジン(PCP) や ケタミンなども幻覚作用を発現する。しかし、これらの 3 種類の幻覚発現薬の類似点や相違点も明確にされていない。次々と乱用目的に合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発や上記 3 種類の幻覚発現薬と各評価法への適正を明らかにすることが望まれる。そこで、幻覚発現薬の実験動物を用いた各評価に関する調査研究を実施した。各研究では、下記目的の基で研究を実行した。

指定薬物は中枢神経系に作用して、興奮若しくは、抑制又は幻覚作用を発現する薬物に分類される。これらを指定薬物として指定するにあたり、薬物による中枢興奮作用や抑制作用については自発運動量、脳内アミン量の変化、受容体結合実験などの結果から指定が行われているが、幻覚作用の評価は非常に困難である。これまでに幻覚作用を発現することが知られている 5-HT_{2A} 受容体アゴニストなどは、マウスにおいて首振り反応 Head

Twitch Response (HTR) を誘発することが明らかにされている。また、薬物を摂取した時の感覚効果を評価する薬物弁別法では幻覚作用を発現することが知られている。3,4-methylenedioxy methamphetamine (MDMA) の弁別刺激効果に対して 5-HT_{2A} 受容体アゴニストの 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が般化することから類似した感覚効果を示す可能性が明らかにされている。さらに、 κ -オピオイド受容体作動薬であるサルビンリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている。 κ -オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す。加えて、NMDA 受容体拮抗薬の phencyclidine (PCP) や ketamine なども幻覚作用を発現する。しかし、これらの 3 種類の幻覚発現薬の類似点や相違点も明確にされていない。次々と乱用目的に合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発や上記 3 種類の幻覚発現薬と各評価法への適正を明らかにすることが望まれる。そこで、本研究では先ず κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用しマウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference test) を実施した。さらに、幻覚発現薬では情動異常を引き起こす可能性が考えられたため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。危険ドラッグとして合成カンナビノイド、カチノン系化合物、オピオイド化合物および催幻覚物質などが流通し、事件事故、健康被害が発生し

ており、世界的な問題となっている。

催幻覚物質として、インドールアミン系とフェニルアルキルアミン系という 2 つの化学構造を有する化合物群が知られている。フェニルアルキルアミン系幻覚剤として、フェニルイソプロピルアミン (2,5-ジメトキシ-4-ヨードアンフェタミン (DOI)、2,5-ヨードアンフェタミン (DOI)、ジメトキシ-4-メチルアンフェタミン (DOM) などが流通している。こうした化合物群は、ラットやマウスの動物実験において、特徴的な首振り反応 Head Twitch Response (HTR) を示すことが報告されており、幻覚作用を反映する行動モデルとして注目されている。

幻覚作用を示す危険ドラッグの法規制のためには、幻覚作用を適切に評価するためのシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR) の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示唆されている。セロトニン受容体作用を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR) に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。

危険ドラッグが依然として大きな社会問題となっている。それに伴い、危険ドラッグの速やかな規制が求められており、そのた

めの迅速な評価法開発が急務となっている。評価法の検討には、使用する化合物の供給が必要不可欠である。本研究では幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。

依存形成薬物には独特な感覚効果、即ち自覚効果があり、これを求めて精神依存が引き起こされ、乱用される。この薬物を摂取した時の感覚効果を動物において判別する試験法としては薬物弁別法が古くから用いられてきている。薬物弁別法ではヒトにおいて摂取した薬物により誘発される自覚効果を動物における弁別刺激効果と定義し、薬物の摂取感覚効果の類似性の証明や作用機序を解明することが可能となる。近年問題となってきた危険ドラッグは、幻覚作用をはじめとする自覚効果を引き起こすとされている。また、危険ドラッグを含めて多くの薬物は、自発運動に影響を及ぼすことも知られている。近年社会問題となった危険ドラッグの乱用は、法の網をくぐり抜けるため既知の骨格に対して様々な修飾がなされた薬物が流通し、社会問題となってきた。こうした問題に対して、多くの危険ドラッグの共通構造であるカチノンあるいはカンナビノイド系の骨格に対する包括規制により危険ドラッグの乱用問題は鎮静化がなされてきている。しかしながら、これまでに乱用が問題となった機序を有する別の骨格、あるいは諸外国で乱用が問題となってきたピペリジン系薬物、NMDA 受容体遮断薬あるいはオピオイド受容体作動薬の類自体の乱用問題に備える必要が出てきている。一方で、新たなタイプの危険ドラッグが出現した場合に、これら

を評価する評価系の構築が十分ではないのが現状である。そこで、摂取感覚および行動変化による薬物乱用の評価による蓋然性評価のための評価系を検討することとした。

幻覚作用を有する指定薬物の指定に係る基本的評価指標を確立するため、5-HT_{2A} 受容体アゴニストである 1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) をマウスに投与した場合の異常行動について、その発現様式、時間依存性、各異常行動間の頻度の相関性を検討する。同時に、脳特に大脳皮質、線条体および側坐核、海馬各部位におけるモノアミンおよびその代謝物の量的変動を調べ、異常行動との相関関係を調べる。新奇環境に暴露されたときのマウスの行動に DOI がどのような影響を与えるかについて、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験を合わせて実施した。

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。一方において、我々は、ドーパが神経伝達物質として機能する知見を集積してきた。ドーパは、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって遊離され、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制する。ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステル (DOPA CHE) によって抑制される。長い間、ドーパに対する受容体は不明であったが、我々は、眼白子症の原因遺伝子産物である G タンパク質共役型受容体

(GPCR) の GPR143 がドーパ受容体の一つであることを見出した。GPR143 欠損 (GPR143 KO) マウスを用いて表現型解析を行なった結果、ニコチンによる運動量変化および報酬効果が、GPR143 KO マウスにおいて野生型 (WT) と比較し、減弱した。また、抗精神病薬の薬理作用についても GPR143 KO マウスにおいて抑制される。これらのことは、精神賦活薬によって遊離されたドーパが、GPR143 を介して精神症状を発現することを示す。本研究においては、ドーパ、ドーパミン、セロトニンの遊離および、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 各研究の目的、方法、結果

[研究-1 : 幻覚発現物質の評価検証を目指した試験法の開発]

鈴木 勉

湘南医療大学 薬学部

指定薬物は中枢神経系に作用して、興奮若しくは、抑制又は幻覚作用を発現する薬物に分類される。これらを指定薬物として指定するにあたり、薬物による中枢興奮作用や抑制作用については自発運動量、脳内アミン量の変化、受容体結合実験などの結果から指定が行われているが、幻覚作用の評価は非常に困難である。これまでに幻覚作用を発現することが知られている 5-HT_{2A} 受容体アゴニストなどは、マウスにおいて首振り反応 Head

Twitch Response (HTR) を誘発することが明らかにされている。また、薬物を摂取した時の感覚効果を評価する薬物弁別法では幻覚作用を発現することが知られている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の弁別刺激効果に対して 5-HT_{2A} 受容体アゴニストの 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が般化することから類似した感覚効果を示すことが明らかにされている。さらに、 κ -オピオイド受容体作動薬であるサルビノリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている。 κ -オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す。加えて、NMDA 受容体拮抗薬の phencyclidine (PCP) や ketamine なども幻覚作用を発現する。しかし、これらの 3 種類の幻覚発現薬の類似点や相違点も明確にされていない。次々と乱用目的に合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発や上記 3 種類の幻覚発現薬と各評価法への適正を明らかにすることが望まれる。そこで、本研究では先ず κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用しマウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference test) を実施した。さらに、幻覚発現薬では情動異常を引き起こす可能性が考えられたため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。使用動物: すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl、25-30 g、日本クレア) を使用した。動物実験は、湘南医療大学動物実験委員

会の承認を得て行った（承認番号 8 号および 11 号）。

【研究-2：危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究】

船田正彦

湘南医療大学 薬学部

幻覚作用を示す危険ドラッグの法規制のためには、幻覚作用を適切に評価するためのシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR) の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係を探ることで、幻覚作用の発現予測ができることが示唆されている。セロトニン受容体作用薬を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR) に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。

HTR を定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。マグネットメーターは、ポリウレタン銅線を使用して、直径 16 cm のコイルを作製し、直径 15 cm の円筒ビーカーに装着した。実験には、ICR 系マウスを使用した。マウスの頭蓋表面に強力な磁力を有するマグネットをデンタルセメントで留置して、装置内での HTR の動きで感知される電気信号を測定した。装置上部より、

ビデオ撮影を行い、行動変化と電気信号の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。マグネットメーターの使用（40-200Hz のフィルター処理）で、DOI 投与後、多数の HTR の発現を確認することが可能であった。また、DOI の用量依存的な HTR の発現が確認された。同様に、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用薬 TCB-2 投与においても、HTR の特異的なシグナルを分離することが可能であった。設定条件では、DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。これらの効果は、選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬である MDL100907 の前処置により完全に抑制された。

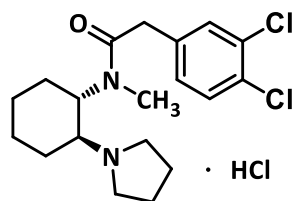
【研究-3：幻覚作用を有する薬物の合成】

栗原正明

湘南医療大学 薬学部

危険ドラッグが依然として大きな社会問題となっている。それに伴い、危険ドラッグの速やかな規制が求められており、そのための迅速な評価法開発が急務となっている。評価法の検討には、使用する化合物の供給が必要不可欠である。本研究では幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。

合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。U50,488 の合成を行った。出発原料として 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を用いた。



(±)-U50,488H

【研究-4：摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価】

森 友久

星薬科大学 薬学部

依存形成薬物には独特な感覚効果、即ち自覚効果があり、これを求めて精神依存が引き起こされ、乱用される。この薬物を摂取した時の感覚効果を動物において判別する試験法としては薬物弁別法が古くから用いられてきている。薬物弁別法ではヒトにおいて摂取した薬物により誘発される自覚効果を動物における弁別刺激効果と定義し、薬物の摂取感覚効果の類似性の証明や作用機序を解明することが可能となる。近年問題となってきた危険ドラッグは、幻覚作用をはじめとする自覚効果を引き起こすとされている。また、危険ドラッグを含めて多くの薬物は、自発運動に影響を及ぼすことも知られている。近年社会問題となった危険ドラッグの乱用は、法の網をくぐり抜けるため既知の骨格に対して様々な修飾がなされた薬物が流通し、社会問題となってきた。こうした問題に対して、多くの危険ドラッグの共通構造であるカチノンあるいはカンナビノイド系の骨格に対する包括規制により危険ドラッグの乱用問題は鎮静化がなされてきている。しかしながら、これまでに乱用が問題となっ

た機序を有する別の骨格、あるいは諸外国で乱用が問題となってきたピペリジン系薬物、NMDA 受容体遮断薬あるいはオピオイド受容体作動薬の類自体の乱用問題に備える必要が出てきている。一方で、新たなタイプの危険ドラッグが出現した場合に、これら进行评估する評価系の構築が十分ではないのが現状である。そこで、摂取感覚および行動変化による薬物乱用の評価による蓋然性評価のための評価系を検討することとした。薬物弁別法 1. 実験動物及び飼育条件：Fischer 344 系雄性ラット（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）を用いた。この動物は恒温恒湿室（23±1 °C、55±5 %）においてプラスチックゲージ内で飼育し、8:00 点灯、20:00 消灯の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお、薬物弁別法で使用したラットについては、体重が 230 g 程度になるよう摂餌制限を行った。なお飲水（水道水）は自由とした。2. 弁別装置：実験には、オペラントボックス（model GT8810、小原医科産業株式会社、東京）を使用した。オペラントボックス内の床はグリットとし、ボックス内には左右に 2 つのレバーを設置し、左右のレバーの間に強化子の給仕皿が 1 つ設置されているものを使用した。また、強化子として精密錠剤型飼料（20 mg; 小原医科産業株式会社、東京）を用いた。3. 弁別訓練：MDMA、U50,488H あるいは quinpirole と vehicle との弁別訓練を開始する前に、すべてのラットにレバー押し訓練を行った。レバー押し訓練には左右どちらかのレバーが提示され、LLRLLRR（L= 左、R= 右）の順序でまず Fixed Ratio (FR) 1 強化スケジュールでレバー押し訓練を行った。また、

1 セッションは 15 分 とし、レバーを押すと強化子が与えられるスケジュールを用いた。1 セッションのレバー押し回数が 40 回に達した時点で FR1 におけるレバー押しが確立されたものとし、徐々に FR2、FR4、FR6、FR8、さらに FR10 へと増加させた。

FR10 での反応率 (response rate) が安定した後、薬物と vehicle との弁別訓練を FR10 スケジュールで行った。弁別訓練では 1 セッションを 15 分間とし、弁別訓練開始 30 分前に 薬物または vehicle を皮下投与した。各セッションの投与順序は DDVV... (D=薬物、V=Vehicle) とし、薬物もしくは溶媒投与時の左右のレバーの選択は、動物の嗜好性による片寄り (ばらつき) を避けるためにカウンターバランス法 (L=D、R=V の対応と L=V、R=D の対応の装置をそれぞれ 2 組用意した) を使用した。弁別獲得の基準は、最初の強化子を得るためのレバー押しの回数を First Food Pellet (FFP) として測定し、訓練において 5 日間連続して $FFP \leq 12$ (正反応率 83% 以上) となった場合を弁別獲得とし、弁別訓練は弁別獲得後も継続した。4. 般化試験：般化試験は、薬物およびその溶媒の弁別獲得後、弁別訓練を継続しながら 3 日間連続して $FFP \leq 12$ を達成した際に行った。テストセッションは、ラットがオペラントボックス内の左右いずれかのレバーを合計 10 回押しした時点で終了とした。また、セッション開始から 15 分が経過した時点で 10 回のレバー押し反応を認めなかった場合は反応が崩壊したと判断し、セッションを終了した。統計解析：実験における測定値は、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) として表示

した。テストセッションにおいては、総レバー押し回数に対する薬物側レバー押し回数の割合 (%) で求めた。訓練薬物の弁別刺激効果に対し、80 % を超えて薬物側レバー押し反応を示したものを般化とし、50-79 % の範囲を部分般化とし、50 % を下回る薬物側レバー押し反応を示したものを般化しなかったと判断した。また、反応率 (response rate) はレバーを問わず、10 回反応するまでの時間を 1 分間あたりのレバー押し回数に換算して求めた。自発運動量における統計解析には、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M) として表記し、統計学的有意差の評価は、Two-way ANOVA によって解析した後は、Bonferroni test に従って post-hoc test によって行った。

1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) および 1-(3-chlorophenyl)-piperidine (3-CPP) を用いて MDMA の弁別刺激効果に対する般化試験を行ったところ、前年度、3-CPP は MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示し、TFMPP は般化を示さなかったことから、本年度はさらに phenylpiperadine による般化試験を行った。その結果、phenylpiperadine は、MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示した。これらの結果が自発運動量変化に相関するか否かについて検討したところ、MDMA の弁別刺激効果に般化を示した 3-CPP および phenylpiperadine では自発運動の亢進作用を示さなかったものの、TFMPP では弱いながらも自発運動亢進作用を示した。

NMDA 拮抗薬についての蓋然性評価を行うための系の構築のために ketamine を用いて行動評価を行った。Ketamine は、5-20mg/kg

の範囲で用量依存的な自発運動亢進作用が認められた。Ketamine (10 mg/kg)により発現する自発運動促進効果の機序を解析するために、prepro-enkephalin 欠損マウスを用いて C57BL/6J マウスの運動量と比較検討したところ、prepro-enkephalin 欠損マウスにおいて自発運動の有意な低値が確認された。本研究結果を受容体レベルで検討するために、各選択的受容体拮抗薬について検討したところ、naloxone (1 mg/kg) は影響を与えずに naltrindole は、ketamine により誘発される自発運動促進効果を有意に抑制した。さらに、細胞内伝達において、検討したところ、塩化リチウムは、ketamine により誘発される自発運動促進効果に対して影響を及ぼさなかったが、PF-2545920 はほぼ完全に抑制した。

Ketamine の依存性をより正確に捉えるために MDMA、U50,488H あるいは quinpirole という幻覚誘発と密接に関連する薬物によって誘発される摂取感覚と ketamine により発現する感覚との類似性を検討したところ、ketamine は MDMA、U50,488H および quinpirole の弁別刺激効果に対していずれも部分的に般化した。

[研究-5：幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・モノアミン代謝回転について]

北中純一

兵庫科大学 薬学部

幻覚作用を有する指定薬物の指定に係る基本的評価指標を確立するため、5-HT_{2A} 受容体アゴニストである 1-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI)

をマウスに投与した場合の異常行動について、その発現様式、時間依存性、各異常行動間の頻度の相関性を検討する。同時に、脳特に大脳皮質、線条体および側坐核、海馬各部位におけるモノアミンおよびその代謝物の量的変動を調べ、異常行動との相関関係を調べる。新奇環境に暴露されたときのマウスの行動に DOI がどのような影響を与えるかについて、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験を合わせて実施した。ICR 系雄性マウス (実験時 11-12 週齢) に対して、生理食塩水に希釈した DOI の 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg を皮下投与 (s.c.) し、直ちに観察用アクリルボックス (30×30×35 cm 高; 床面に約 25 g 分の木くず) に入れて行動観察および Supermex センサによる水平方向総運動量の測定を行った。行動観察は、投与薬物が知らされていない熟練した複数の観察者によって行われた。DOI による特異的な行動の観察項目は、前肢洗顔行動・伏臥位・後肢引っ掻き行動・首振り行動とし、30 秒ごとに前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動の回数を記録し、伏臥位や首振りが確認されたか否かを記録した。観察後直ちに脳各部位を摘出して液体窒素中に保存した。モノアミンおよびその代謝物含量は、電気化学検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (ECD-HPLC) で検出した。DOI 投与下の新奇環境への順化を検討するため、新奇物体探索行動およびガラス玉埋め試験を行った。

(倫理面への配慮) 兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得た (承認課題第 20-059A 号 (改訂) および第 22-303A 号 (改訂))。「動物実験に関する日本薬理学会指針」ならびに「動物

実験の適正な実施に向けたガイドライン」
(日本学術会議、2006年6月1日)および兵庫医科大学動物実験規定を遵守した。動物逃避防止を徹底し実験動物に苦痛を与えないよう最大限配慮を行い、人道的エンドポイントを十分配慮のうえ安全対策を講じて、承認を受けた実験室でのみ実施した。水平方向の総運動量測定について、タイムコースは新奇環境への馴化パターンを示しており興奮性は認められなかったが、DOI用量が高いほど総運動量は大きい傾向を示した。特に 1.0 mg/kg, s.c.での運動量は対照群と比較して有意に増加した。行動指標としては、前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動は DOI 投与 15 分で主に観察され、20 分過ぎまで継続しその後頻度は減少した。引き続き、伏臥位が発現し、投与 1 時間まで継続した。特に前肢洗顔行動と伏臥位の発現頻度間で、強い相関関係が認められた。首振り投与後 1 時間内に観察が間断的に継続した。首振り行動以外の異常行動は DOI の用量反応性を示した。脳内モノアミン量 (ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン、およびそれらの代謝物) の変動と、そこから導き出されるモノアミン代謝回転の程度に関して、ECD-HPLC 測定の結果、行動変化に相関するようなモノアミン代謝回転の変動は認められなかった。新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験において、1.0 mg/kg DOI 投与はそれら新奇環境への関心度の低下とみられる行動 (新奇物体への接触頻度低下およびガラス玉埋め総数の減少) が確認された。

[研究-6 : 危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究]

増川太輝

横浜市立大学 医学部

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) によるドーパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。一方において、我々は、ドーパが神経伝達物質として機能する知見を集積してきたり。ドーパは、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって遊離され、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制する。ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステル (DOPA CHE) によって抑制される。長い間、ドーパに対する受容体は不明であったが、我々は、眼白子症の原因遺伝子産物である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の GPR143 がドーパ受容体の一つであることを見出した。GPR143 欠損 (GPR143 KO) マウスを用いて表現型解析を行なった結果、ニコチンによる運動量変化および報酬効果が、GPR143 KO マウスにおいて野生型 (WT) と比較し、減弱した。また、抗精神病薬の薬理作用についても GPR143 KO マウスにおいて抑制される。これらのことは、精神賦活薬によって遊離されたドーパが、GPR143 を介して精神症状を発現することを示す。本研究においては、ドーパ、ドーパミン、セロトニンの遊離および、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを

通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。1. 実験動物：実験には、6-12 週齢の GPR143 KO マウスおよび WT マウス（体重 20-28 g）を用いた。

動物実験は、横浜市立大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号 F-A-23-010）。2. 運動量測定：自発運動量を評価するため、マウスは運動量測定試験の少なくとも1時間前に防音室の環境に順化させた。その後、使用するマウスをそれぞれ70ルクスの照明条件に設定されたチャンバー（50×50×40cm³）に入れた。移動距離（cm）は 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) および saline 投与前 60 分、後 120 分間記録した。Open fieldでの活動は、画像ソフト（TimeOFER4：O'Hara & Co., Ltd, Tokyo, Japan）を用いて定量化した。3. 免疫染色：DOI (1 mg/kg) または saline を腹腔内投与し、1 時間後に、イソフルラン（3%）の吸入麻酔下で、4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。側坐核を含む 50 μm の切片をビブラトームを用いて作成した。抗 c-Fos 抗体（1:1000, Cell Signaling）を用いて、一次抗体反応後、Alexa fluoro 488 goat anti-rabbit IgG plus 抗体により可視化した。また DAPI を用いて核を可視化した。蛍光シグナルは、AX 顕微鏡（Leica）により観察した。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を計測し、定量化した。4. 神経伝達物質遊離量測定：ドーパ、ドパミンおよびセロトニンを同時に測定するために、マイクロダイアリシを行った。マウスをイソフルラン（3%）の吸入麻酔下で、脳定位装置を用いて頭部を固定し、ガイド（AG-6）およびダミー（AD-6）カニュー

レ（Eicom, Kyoto, Japan）を側坐核（Bregmaより前方1.5 mm、左右 0.9 mm、深さ 4.9 mm）に挿入した。手術から 2 日後、マイクロダイアリシプローブ（FX-I-6-02, Eicom, Kyoto）を留置していたガイドカニューレに挿入し、2 μL/min の流速で、リングル液を注入した。2 時間の馴化後、20 分おきにサンプルを回収した。サンプルは、等量の 0.1% ギ酸を含む超純水を展開溶媒として混合し、測定まで -80°C で保存した。回収したサンプルにおけるドーパ、ドパミン、セロトニンの濃度は、MicroLC-MS/MS（Xevo TQS, MA, U.S.A）により測定した。分析カラムには UPLC column ACQUITY HSS T3 C18（WT186003539, Waters, MA, U.S.A）、とガードカラムには guard column（WT186003976, Waters, MA, U.S.A）を、移動相には 3% アセトニトリルと 0.1% ギ酸を含む超純水を用いた。5. ウェスタンブロット解析：セロトニン 2A (5-HT_{2A}) 受容体-mCherry を安定に発現している Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に、FuGENE6 を用いて Gpr143-flag および pSN-flag プラスミドでそれぞれ導入した。2日間の培養後、DOI（1 および 10 μM）を処理し、免疫沈降バッファー（20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Nonidet P-40, 0.1%プロテアーゼ阻害剤）で溶解した。サンプルをSDS-PAGE（9%）で分離、PVDF メンブレンに転写し、抗 extracellular signal-regulated kinase (ERK)、pERK 抗体（#9102, #9101, Cell Signaling）を用いて各タンパク質量を定量した。6. 統計解析：全てのデータは、平均値±標準誤差により示し、Prism 10 により解析した。データは三元または二元

配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、ポストホックテストとして、Tukey's または Bonferroni's multiple comparison test により比較した。研究結果: GPR143 は DOI による薬理作用を負に制御する: GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を修飾するか否かを明らかにするため、まず、DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与による自発運動促進作用を WT および GPR143 KO マウスを用いて比較・検討した。DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させた。その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,26)=39.76$, $P<0.001$; genotype, $F(1,26)=5.430$, $P=0.028$; interaction, $F(1,26)=4.757$, $P=0.038$)。次に、DOI (1 mg/kg) 投与による側坐核における c-Fos 発現変化について検討した。運動量と同様、DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させ、その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,16)=94.77$, $P<0.001$; genotype, $F(1,16)=2.951$, $P=0.105$; interaction, $F(1,16)=5.543$, $P=0.032$)。2. ドーパ、ドパミン、セロトニンは側坐核より遊離する: 我々は昨年度の報告においてドーパとドパミンの同時測定系を確立している。検出時間を延長させたところ、ドーパ、ドパミンに加えてセロトニンのスタンダードシグナルが検出され、このシグナルは側坐核におけるマイクロダイアリスサンプルでも確認できた。よって脳内における 3 種神経伝達物質の同時測定系が確立できた。来年度には幻覚薬によるドーパ遊離の変化を解析する予定である。

さらに、5-HT_{2A} 受容体と GPR143 の直接

的な機能連関を明らかにするため、5-HT_{2A} 受容体を安定的に発現する CHO 細胞に GPR143 を発現させ、DOI 刺激による ERK のリン酸化反応を検討した。DOI は ERK のリン酸化タンパク質量を増加させたが、その効果は GPR143 を発現させることにより増強した (dose, $F(2,28)=35.50$, $P<0.001$; plasmid, $F(1,14)=4.726$, $P=0.047$; interaction, $F(2,28)=4.619$, $P=0.019$)。これらの結果は、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を負に制御することを示唆する。

C. 考察

1. 幻覚物質の評価 (嫌悪効果) に関する調査

κ -オピオイド受容体アゴニストでありヒトでの乱用もされているサルビノリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている。 κ -オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示めず。他の先行研究同様に CPP 法において κ -オピオイド受容体作動薬で嫌悪効果が認められている。 κ -オピオイド受容体作動薬は、高用量投与では鎮静作用が認められる。U50,488H 10 mg/kg での条件づけで嫌悪効果の消失が認められたのはこの鎮静作用に起因すると考えられる。さらに、本研究では、5-HT₂ 受容体作動薬 DOI 誘発の嫌悪効果を初めて捉えることに成功した。U50,488H および DOI による嫌悪効果は、幻覚発現薬の幻覚作用に起因していると考えられる。幻覚作用に起因

すると考えられる嫌悪効果は、U50,488H では最終投与の 4 日後まで少なくとも持続していることが明らかとなった。一方、DOI では同様の嫌悪効果は認められなかったため、幻覚作用に起因した嫌悪効果は U50,488Hの方が強度として大きいことが考えられた。本試験を用いることで、嫌悪作用を指標とした幻覚発現薬の幻覚作用を定量化・数値化して評価可能であると考えられた。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ -オピオイド受容体作動薬 U50,488H 0.3-3 mg/kg の急性投与において情動異常を検出できた。この情動異常は、U50,488Hによる幻覚発現に起因することも考えられた。さらに、3 日間の投与の条件付け終了 24 時間後の day 4 にも U50,488H 1 mg/kg 投与群で情動異常を検出できた。この情動異常は、複数回の U50,488H 投与による嫌悪効果を伴う幻覚発現が情動に影響を及ぼしたと考えられた。5-HT₂ 受容体作動薬 DOI 0.3-3 mg/kg の急性投与において情動異常を検出できた。この情動異常は、U50,488H と同様に幻覚発現に起因することも考えられた。さらに、3 日間の投与の条件付け終了 24 時間後の day 4 の DOI 1 および 3 mg/kg 投与群、さらに day 7 の DOI 3 mg/kg 投与群で情動異常を検出できた。この情動異常は、複数回の DOI 投与による嫌悪効果を伴う幻覚発現が情動に影響を及ぼしたと考えられた。幻覚作用に起因すると考えられる情動異常は、DOI では最終投与の 4 日後まで少なくとも持続していることが明らかとなった。情動面での影響は、U50,488H に比べ DOI の方がより強力であると考えられた。

本試験を用いることで、幻覚発現薬の幻覚発現に伴う情動異常が評価可能であると考えられた。

2. 危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

セロトニン系化合物については、マウスを用いた HTR アッセイを、ヒトにおける幻覚作用を予測するための前臨床モデルとして用いることが可能であると考えられる。また、セロトニン受容体作用薬によるマウスの首振り反応の発現には、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。本解析手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

3. 幻覚作用を有する薬物の合成

U50, 488 はキラルな分子であるので、鏡像体間で生物活性が違うことが予測される。光学活性な U50, 488 を合成することは重要なことと考えられるので、光学活性を得る方法の検討を行うことを考えたい。

4. 摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価

Piperidine 誘導体の評価：ほとんどの依存形成薬物は、脳内のモノアミン神経系を活性化することにより精神刺激薬様の摂取感覚効果を誘発すると同時に、齧歯類においては自発運動促進効果を引き起こす。このような背景からこれまで自発運動促進効果が引き起こされる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚効果を引き起こし、自発運動を検討することは、薬物依存性を評価する指標として有用であるとされてきた。特に、近年乱用が問題となってきた幻覚誘発物質は、自己投与法あるいは条件付け場所嗜好性試験によって強い精神依存を引き起こしにくいことから自発運動あるいは摂取感覚効果による評価の必要性が高まっていた。昨年度、麻薬に指定されている TFMPP および 3-CPP を用いて MDMA 様の弁別刺激効果の発現の有無について検討したところ、3-CPP は MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示したのに対し、TFMPP は般化を示さなかった。これらの結果をもとに従来の一般的な考え方が当てはまるか否かを検討したところ、TFMPP によって自発運動促進効果が認められたものの、3-CPP では自発運動促進効果は認められなかった。3-TFMPP および 3-CPP は phenylpiperadine 骨格を有し、これまで世界各国においても乱用がカチノン系薬物と比べ問題となつてこなかったが、各国でカチノン系薬物の規制が強まり、今後、誘導体化がしやすいピペラジン誘導体の合成および乱用が懸念される。そこで、置換基を持たない

phenylpiperadine そのものに依存形成能があるかについて検討したところ、phenylpiperadine は、自発運動促進効果に影響を及ぼさなかったものの、MDMA 様の弁別刺激効果を有していることが示された。以上の結果より、phenylpiperadine 骨格を有する薬物の評価において、自発運動促進効果と MDMA 様の弁別刺激効果に相関は認められないものの、いずれも乱用の危険性があることを示唆された。こうした自発運動促進効果と MDMA 様の弁別刺激効果の間に相関が認められない例はカチノン系ドラッグのいくつかには認められており、セロトニン系受容体を刺激する母核を持った薬物の蓋然性評価においては、少なくとも1つの評価系では十分ではなく、自発運動と MDMA 様の弁別刺激効果、あるいは行動観察などを含め複数の評価系を用いて検討する必要があると考えられた。NMDA-拮抗薬の評価：NMDA-受容体を遮断して依存性を発現すると考えられている ketamine の行動変化を評価することにより乱用に関する蓋然性評価系の構築についての検討を行った。Ketamine を処置することにより用量依存的な歩行失調を伴う自発運動促進効果が認められた。このうち 10mg/kg の ketamine によって発現する自発運動促進効果は、enkephalin 欠損マウスおよび δ -受容体拮抗薬である naltrindole によって抑制された。また、GSK-3 β を阻害する塩酸リチウムでは、ketamine の効果は抑制されなかったものの phosphodiesterase 10 阻害薬である PF-2545920 によってほぼ完全に抑制された。これらの抑制が認められた条件では、methamphetamine によって発現する自発運動

促進効果は全く抑制されないことが一般的に知られているため、ketamine の精神刺激作用の発現機序は methamphetamine による機序とは明らかに異なることが示唆された。よって、今後は、本研究結果をもとに、全く新たな評価系として NMDA-遮断作用を有する薬物を評価する系を構築していく。

さらに、弁別刺激効果を指標に蓋然性評価系の構築を行うことを念頭に、幻覚誘発薬としての ketamine の感覚について検討した。幻覚を発現する機序を持つ MDMA、U50,488H(κ -受容体作動薬)あるいは quinpirole (D_2 -受容体作動薬)の摂取感覚の弁別を可能としたラットを用いて ketamine との類似性を般化試験により検討した。その結果、ketamine はいずれの薬物の弁別刺激効果に対して部分的般化を示した。以上のように、ketamine は、各種幻覚誘発物質とある程度共通する感覚を有しており、ketamine の感覚との類似性は、幻覚誘発薬の乱用を予測する系の構築に重要であると考えられた。今後 ketamine により弁別を獲得した動物を作製し、こうした動物によって NMDA-拮抗薬に特有の感覚から乱用の危険性についての蓋然性評価系を検討していく。

5. 幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・モノアミン代謝回転について

前肢洗顔行動と伏臥位は、いずれも DOI の用量依存的に発現し、かつそれらの発現頻度間には強い相関関係 ($R^2 = 0.6197$) が認められた。一方、たとえば後肢引っ掻き行動(投与後 0-20 分)と伏臥位(投与後 20-60 分)と

の間 ($R^2 = 0.1213$)、あるいは、前肢洗顔行動(60 分間)と後肢引っ掻き行動(60 分間)の頻度間では相関関係は認められなかった ($R^2 = 0.4587$)。この結果は、ICR 系マウスを用いた場合、DOI のような幻覚作用を有している薬物の異常行動指標として、投与後前肢洗顔行動、そして引き続いて伏臥位が認められた場合、DOI の幻覚作用を評価する行動基準となり得ることを示している。従来、首振り行動は幻覚剤のげっ歯類における、よく知られた反応である。しかし本研究で用いた実験系では、もっとも用量反応性に乏しい行動パターンであった。首振り行動は特異な行動の一つであり、明らかに DOI 投与で誘導されているので、動物種(あるいはその系統)に影響を受けている結果の可能性は否定できない。評価系としては、幻覚剤の作用の強さを検定あるいは予測する上で、用量反応性を考慮しなければならない。その用量反応性については、マウスのおかれた研究環境の違い(たとえば観察ボックス内の環境=床敷きの有無など)に起因する可能性がある。

DOI 投与マウスは、5-HT₂ 受容体を介した短期空間記憶力の低下がマウスにおいて認められているため、新奇環境への順化は影響を受けることが予想された。事実、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験における測定パラメータの減少は、新奇環境への関心の低下を示しており、それが前肢洗顔行動や伏臥位といった異常行動の発現とどのような関係にあるのかについて、さらに検討を進めたい。

6. 危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

本研究では、GPR143 KO マウスにおいて DOI による運動量促進作用および c-Fos 発現増加作用が増強された。また、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定系を確立した。これらの結果は、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

ドーパは、GPR143 のリガンドなので、内在性に遊離するドーパが、5-HT2A 受容体の機能を制御する可能性が高い。ドーパの遊離は、メタンフェタミンやニコチンなどのドパミン神経賦活薬によって、増加する。メタンフェタミンおよびニコチンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬である DOPA CHE により抑制される。今後は、ドーパが GPR143 を媒介し、精神症状を示すのか？ドーパは、指定薬物による幻覚作用を媒介するのか？ドーパはどのような指定薬物によって遊離されるのか？を明らかにする必要である。

GPR143 は、他の GPCR と複合体を形成することによって、その機能を修飾することが報告されている。実際に GPR143 は、アドレナリン $\alpha 1$ 受容体との機能連関を介して生理的な血圧調節を担う。線条体において、ドパミン D2 受容体と相互作用し、ドパミン D2 受容体を介する薬理作用を調節する。本年度の CHO 細胞を用いた実験結果より、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に修飾することが明らかとなった。このことは、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を複合体形成を介して抑制している可能性を示唆する。GPR143 とセロトニン 2A 受容体との機能

連関メカニズムについて、更なる検討が必要である。

D. 結論

本研究では指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に取り組み、初年度に以下のような成果を得ることができた。幻覚発現物質の評価検証を目指した試験法の開発では、以下の結論が導かれた。幻覚作用の客観的評価が困難な要因として、定量化・数値化が難しいことが考えられる。本研究では、幻覚発現薬と考えられる薬物において条件づけ場所嗜好性試験で嫌悪効果を認めた。この嫌悪効果は幻覚発現を比較的短期間となる計 5 日間で評価可能であり、かつ定量化・数値化できると考えられた。さらに、ガラス玉覆い隠し試験で情動異常を認めた。この情動異常は幻覚発現を定量化・数値化していると考えられた。これまでの研究成果も踏まえつつ、幻覚を評価するための現行法の改良や新たな簡便で効率的な評価法の確立に向けて研究を進めていきたい。危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究では、以下の結論が導かれた。本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。幻覚作用を有する薬物の合成では、以下の結論が導かれた。7-

oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、6段階でトータル収率約20%でU50,488を合成した。合成したU50,488は塩酸塩として、評価を行う各分担研究者に供した。今後も、幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行う。摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価では、以下の結論が導かれた。弁別刺激効果による蓋然性評価と比べ、自発運動促進効果による評価は非常に簡便でスクリーニング的にも非常に有用と考えられてきた。しかしながら、蓋然性評価において、乱用の危険性があるものの、運動の活性化作用を有さない薬物が多数存在するために自発運動に頼った評価では、多くの偽陰性が懸念される。弁別刺激効果においては、その選択性の高さから訓練薬物と機序が異なる場合には、類似性を示さないことが十分に想定される。乱用が予測される新規化合物の蓋然性評価において、こうした各評価系の特徴を考えた上でも、評価する構造に特異的な行動変化を評価出来る評価系をいくつか構築し、これらを使用して包括的に評価する必要があると考えられる。幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・モノアミン代謝回転については、以下の結論が導かれた。幻覚剤による異常行動は、ICR系マウスを実験系とした場合、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度とが、用量依存性、発現強度の相関性の観点から有効な観察基準と考えられた。それらの異常行動と、DOIによる環境変化への関心低下との間の関係について、今後、学習・短期空間記憶（Morris水迷路試験）と行動変化との関連を調べる（行動

評価方法の検証)。また DOI 用量反応性に行動相関が認められる前肢洗顔行動および伏臥位を制御するメカニズム (5-HT₂受容体系、opioid 受容体系、視床下部ヒスタミン系等) を明らかにして、情報伝達物質の量的変動から幻覚剤の評価が可能か検証したい。危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究では、以下の結論が導かれた。本研究では、① GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を抑制することを明らかにし、②ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離測定系を確立した。ドーパ測定系が指定薬物の評価に有効であるかを検討する必要がある。

E. 健康危険情報

本研究は、危険ドラッグの中枢作用および毒性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) Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H, Kagaya H. A questionnaire-based study on the “Dame. Zettai. (Never. Ever.)” drug abuse prevention campaign and the medical use of narcotic agents. *Jpn J Pharm Palliat Care Sci.* (2022) 15: 121-128.
- 2) 鈴木 勉. 【別冊秋号オピオイド】(PART2) 基礎編 オピオイド身体依存のメカニズム. LiSA 別冊. (2022) 29別冊 165-168.
- 3) Mori T, Iwase Y, Uzawa N, Takahashi Y, Mochizuki A, Fukase M, Shibasaki M,

- Suzuki T. Synergistic effects of MDMA and ethanol on behavior: possible effects of ethanol on dopamine D₂-receptor-related signaling. (2021) *Addict Biol* e13000.
- 4) Mori T., Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T. Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice. (2021) *Behav Brain Res.* 396: 112802.
- 5) Sato D, Hamada Y, Narita M, Mori T., Tezuka H, Suda Y, Tanaka T, Yoshida S, Tamura H, Yamanaka A, Senba E, Kuzumaki N, Narita M. Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D₁-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens. (2022) *Molecular Brain* 15:17.
- 6) Mori T., Yamashita K, Takahashi K, Mano S, Sato D, Narita M. Characterization of the discriminative stimulus effect of quinpirole: Further evidence for functional interaction between central dopamine D₁/D₂ receptors. (2022) *Pharmacol Biochem Behav.* 213:173314.
- 7) Mori T., Takemura Y, Arima T, Iwase Y, Narita M, Miyano K, Hamada Y, Suda Y, Matsuzawa A, Sugita K, Matsumura S, Sasaki S, Yamauchi T, Higashiyama K, Uezono Y, Yamazaki M, Kuzumaki N, Narita M. Further investigation of the rapid-onset and short-duration action of the G protein-biased μ -ligand oliceridine. *Biochem Biophys Res Commun* (2021) 534: 988-994.
- 8) 船田正彦 : 危険ドラッグの依存性. *精神科*, 41: 239-247, 2022.
- 9) 船田正彦: 海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 54: 36-42, 2023.
- 10) Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M., Kittaka A, Sugiyama T: PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA: *Peptide Science* 2021, 2022, 111-112
- 11) Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M., Jin W, Koike T, Kurosaki H.: Bis(nitrato- κ O)(1,4,8,11-tetra-aza-cyclo-tetra-decane- κ 4 N)zinc(II) methanol monosolvate.: IUCrdata. 2022 Aug 31;7(Pt 8):x220854.
- 12) Yuyama M, Misawa T, Demizu Y, Kanaya T, Kurihara M.: Design and synthesis of novel estrogen receptor antagonists with acetal containing biphenylmethane skeleton: *Results in Chemistry*, 3, 2021, 100124
- 13) Moriya S, Shibasaki H, Kohara M, Kuwata K, Imamura, Y, Demizu Y, Kurihara M., Kittaka A, Sugiyama T: Synthesis and characterization of PNA oligomers containing preQ1 as a positively charged guanine analogue: *Bioorg Med Chem Lett.* 2021, 39, 127850
- 14) Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Takashi Y., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Nishitani Y. & Sato T. Therapeutic potential for KCC2-targeted neurological diseases. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **59**, 431-438 (2023)
- 15) Kitanaka J., Kitanaka N., Tomita K., Hall S.F., Igarashi K., Uhl G.R. & Sato T. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors block morphine-induced locomotor activation, Straub tail, and depression of rearing in mice via a possible central action. *Neurochem. Res.*, **48(7)**, 2230-2240 (2023)

- 16) Tomita K., Oohara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Sugimura, M. & Sato, T. Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression via neuroinflammation induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice. *Heliyon* **9(12)** e22784 (2023).
- 17) Oka M., Yoshino R., Kitanaka N., Hall F.S., Uhl G.R. & Kitanaka J. Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Dependence and Abuse Liability of Alcohol. *Alcohol Alcohol.* **59(2)** agad086 (2024).
- 18) Kitanaka N., Arai K., Takehara K., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & Kitanaka J. Opioid receptor antagonists reduce motivated wheel running behavior in mice. *Behav. Pharmacol.* **35(2/3)**114-121 (2024)
- 19) Masukawa D (corresponding author), Takahagi R, Nakao Y, Goshima Y. L-DOPA Receptor GPR143 Functionally Couples with Adrenergic α 1B Receptor at the Second Transmembrane Interface. *Biol Pharm Bull.* **46**: 869-873, 2023
- 20) Uchimura H, Kanai K, Arai M, Inoue M, Hishimoto A, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate. *J Pharmacol Sci.* **152**: 178-181, 2023
- 21) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, Otaki M, Kanai K, Yamasaki M, Watanabe M, Kambe Y, Murata K, Takada Y, Arisawa T, Kobayashi K, Tajika R, Miyazaki T, Yamaguchi M, Lazarus M, Hayashi Y, Itohara S, de Kerchove d'Exaerde A, Nawa H, Kim R, Bito H, Momiyama T, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* in press.
2. 学会発表
- 1) 鈴木 勉, 長谷川真司, 加賀谷肇:「ダメ。ゼッタイ。」普及運動は医療用麻薬の適正使用に影響しているか? : 日本薬学会第114年会 2024.3.28-31 (神奈川県横浜市)
- 2) 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用の評価と包括規制に関する研究. 第53回日本神経精神薬理学会年会 シンポジウム(東京、2023年7月21日)
- 3) 船田正彦. 米国におけるオピオイド乱用・依存問題の現状. 2023年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (岡山、2023年10月14日)
- 4) Tsukasa Tomizawa, Shuntaro Kikukawa, Hironobu Arita, Kayo Nakamura, Kosho Makino, Hidetsugu Tabata, Tetsuta Oshitari, Hideaki Natsugari, Masahiko Funada, Hideyo Takahashi. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Opioid μ -Receptor Antagonists The 11th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference (in Macao) Aug. 2023.
- 5) 菊川俊太郎、有田浩暢、富澤幸、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、富山健一、高橋秀依「フェンタニル骨格に由来する新規オピオイド μ 受容体アンタゴニストの創製」第84回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(東京、2023年5月)

- 6) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の構造活性相関」日本薬学会 第 143 年会 (札幌、2023 年 3 月)
- 7) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の合成と構造活性相関」第 66 回日本薬学会関東支部大会 (横浜、2022 年 9 月)
- 8) 船田正彦: 危険ドラッグの最新海外事情, 第 20 回日本旅行医学会, Web 開催, 2022 年 5 月 21 日.
- 9) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依: フェンタニル誘導体の構造活性相関, 日本薬学会 第 140 年会, 札幌, 2022 年 3 月 25 日.
- 10) 湯山円晴, 市丸嘉, 荒井裕美子, 金谷貴行, 佐藤忠章, 船田正彦, 栗原正明: ドッキングスタディによる CB1 受容体リガンドの活性予測: 日本薬学会第 142 年会 (2022/03/28) オンライン開催
- 11) 大環状ポリアミン-亜鉛錯体の単結晶 X 線結晶構造解析: 市丸嘉、加藤 紘一、小池 透、黒崎 博雅、栗原正明: 日本薬学会第 143 年会 (2023/03)
- 12) 市丸嘉, 加藤紘一, 栗原正明, 黒崎博雅: アントラセンを導入した Bis(2-picolyl)amine 誘導体-亜鉛錯体の DNA 光切断活性: 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (2023/9/16, 東京)
- 13) Shun-suke Moriya, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Strand invasion by PNA containing preQ1: 第 50 回国際核酸化学シンポジウム (2023/11/1-3) 宮崎
- 14) Shun-suke Moriya, Mai Kiyosue, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Properties of peptide nucleic acid containing n⁴-bis(aminomethyl)-benzoylated cytosine for enhanced DNA binding: 第 60 回ペプチド討論会 (2023/11/8-10) 滋賀
- 15) 湯山円晴, 三澤隆史, 出水庸介, 金谷貴行, 佐藤忠章, 栗原正明: ジフェニルメタン骨格を持つ新規 ER α アнтаゴニストの創製: 日本薬学会第 142 年会 (2022/03/28)
- 16) 栗原正明 (招待講演): 核内受容体に作用する薬物分子の創製: 第 50 回構造活性相関シンポジウム (2022/11/10-11, 名古屋)
- 17) 荒井裕美子, 湯山円晴, 市丸嘉, 佐藤忠章, 栗原正明: QSAR による危険ドラッグのインシリコ活性予測: 第 50 回構造活性相関シンポジウム (2022/11/10-11, 名古屋)
- 18) 荒井 柗美、増川太輝、北村慧、大瀧百々代、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介してハロペリドールによる錐体外路様症状を修飾する第 95 回日本薬理学会年会 (2022 年 11 月 30 日-12 月 3 日)
- 19) 荒井柗美、増川太輝、鈴木江津子、北村慧、大瀧百々代、榎山俊彦、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介して haloperidol 誘発性錐体外路様症状を修飾する. 第 147 回日本薬理学会関東支部会

- (2023年3月21日)
- 20) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、仲井聖典、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、佐藤友昭。 μ オピオイド受容体選択的拮抗薬単独と薬によるマウス動機付け行動への影響 第16回日本緩和医療薬学会 2023.5.26-28 (神戸)
- 21) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭。オピオイド受容体拮抗薬のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響 第64回日本神経病理学会総会学術研究会/第66回日本神経化学会大会 合同大会 2023.7.6-8 (神戸)
- 22) 北中純一、北中順恵、湯瀬祥、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好。幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine は短期空間記憶や気分の障害を引き起こす 第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会 2023.12.14-16 (神戸)
- 23) 湯瀬祥、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一。幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine によって引き起こされる行動異常の特徴について。第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会 2023.12.14-16 (神戸)
- 24) 北中順恵、新井香奈代、竹原薫生子、富田和男、五十嵐健人、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭、北中純一。二、オピオイド受容体拮抗薬ナロキソン単回投与のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響。第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会 2023.12.14-16 (神戸)
- 25) 仲井聖典、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、藤井舞、津嶋祐一郎、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一。GSK-3 阻害薬 CHIR-99021 前処置はモルヒネによる Straub の挙尾反応と退薬症状を抑制する。第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会 2023.12.14-16 (神戸)
- 26) 松田健太郎、北中順恵、濱名貴大、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一。GSK-3 阻害薬 LY2090314 前処置による覚せい剤誘導過運動・常同行動への効果。第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会 2023.12.14-16 (神戸)
- 27) 濱名貴大、北中順恵、仲井聖典、松田健太郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一。ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害薬 Wortmannin は、覚せい剤誘導繰り返し嗅ぎ行動および噛み行動を抑制し、その結果常同行動の発現全体を緩和する。第97回日本薬理学会年会・第44回日本臨床薬理学会学術総会 2023.12.14-16 (神戸)
- 28) 荒井柊美、増川太輝、北村慧、大瀧百々代、五嶋良郎。コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介してハロペリドールによる錐体外路様症状を修飾する 第95回日本

薬理学会年会（2022年11月30日-12月3日）

- 29) 荒井 亜美、増川太輝、鈴木江津子、北村 慧、大瀧百々代、榎山俊彦、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介して haloperidol 誘発性錐体外路様症状を修飾する. 第 147 回日本薬理学会関東部会（2023年3月21日）

G. 知的財産の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他
特になし

令和5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)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

分担研究報告書

分担研究課題:幻覚発現物質の評価検証を目指した
試験法の開発

研究分担者:鈴木 勉 湘南医療大学 薬学部

研究協力者:加藤英明 湘南医療大学 薬学部

【研究要旨】

乱用目的に次々と合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発が望まれる。また、幻覚作用の客観的評価として、定量化・数値化する必要がある。本研究では、幻覚発現薬と作用機序が類似する κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用し、マウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験を実施した。さらに、幻覚発現薬による幻覚発現時には情動異常を引き起こす可能性が考えられるため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。条件づけ場所嗜好性試験においては、 κ オピオイド受容体および 5-HT₂ 受容体作動薬で嫌悪効果を認めた。この嫌悪効果は、おそらく幻覚発現薬の幻覚作用に起因していると考えられる。したがって、本試験を用いることで嫌悪作用を指標とした幻覚発現薬の幻覚作用を評価可能であると考えられる。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ オピオイド受容体作動薬および 5-HT₂ 受容体作動薬で情動異常を検出できた。本試験を用いることで、幻覚発現薬の幻覚発現に伴う情動異常が評価可能であると考えられる。

A. 研究目的

指定薬物は中枢神経系に作用して、興奮若しくは、抑制又は幻覚作用を発現する薬物に分類される。これらを指定薬物として指定するにあたり、

薬物による中枢興奮作用や抑制作用については自発運動量、脳内アミン量の変化、受容体結合実験などの結果から指定が行われているが、幻覚作用の評価は非常に困難である。これまで

に幻覚作用を発現することが知られている 5-HT_{2A} 受容体アゴニストなどは、マウスにおいて首振り反応 Head Twitch Response (HTR) を誘発することが明らかにされている。また、薬物を摂取した時の感覚効果を評価する薬物弁別法では幻覚作用を発現することが知られている 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) の弁別刺激効果に対して 5-HT_{2A} 受容体アゴニストの 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が般化することから類似した感覚効果を示す可能性が明らかにされている。さらに、 κ オピオイド受容体作動薬であるサルビノリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている。 κ オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す。加えて、NMDA 受容体拮抗薬の phencyclidine (PCP) や ketamine なども幻覚作用を発現する。しかし、これらの 3 種類の幻覚発現薬の類似点や相違点も明確にされていない。次々と乱用目的に合成され、市場に出回る幻覚作用を発現する薬物を速やかに評価して、適時に規制して行くためには、精度が高く、簡便で迅速な評価法の開発や上記 3 種類の幻覚発現薬と各評価法への適正を明らかにすることが望まれる。そこで、本研究では先ず κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を使用しマウスを用いた条件づけ場所嗜好性試験

(conditioned place preference test) を実施した。さらに、幻覚発現薬では情動異常を引き起こす可能性が考えられたため、マウスガラス玉覆い隠し試験を実施した。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl、25-30 g、日本クレア) を使用した。動物実験は、湘南医療大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 8 号および 11 号)。

使用薬物：研究分担者が合成した κ オピオイド受容体拮抗薬である (±)-U50,488H (trans-(±)-3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl) cyclohexyl]benzeneacetamide hydrochloride)) および セロトニン 5-HT₂ 作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) を使用した。いずれの薬物も生理食塩液 (大塚製薬) に溶解して使用した。

1. 条件づけ場所嗜好性試験

条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference test: CPP 法) では、白・黒 2 コンパートメントボックス (15 × 30 × 15

cm、幅×全長×高さ)を使用した。ボックスの特徴としては、黒のボックスは平らな床面、白のボックスは凹凸のある床面で構成されており、ボックスの視覚(実験装置壁面の色:白および黒)および触覚(実験装置床面の材質:凹凸)の違いが条件刺激となっている。薬物の条件づけの方法は、前試験法およびカウンターバランス法を組み合わせた方法を採用した。薬物の条件づけ開始前日(day -1)に白・黒 2 コンパートメントボックスの滞在時間(15 分間)を測定し、白・黒 2 コンパートメントボックスの各滞在時間を指標に層別無作為に群分けし、試験する群の中で薬物と溶媒の投与と各ボックスの組み合わせ(薬物-白、薬物-黒、溶媒-白、溶媒-黒)の偏りをなくした条件づけの方法とした。条件づけは次のように行った。動物に薬物あるいはその溶媒である生理食塩液を投与して白あるいは黒のボックスに一定時間(30 分間)閉じ込めた。次に、6 時間の間隔を置き、薬物および溶媒の投与とボックスの組み合わせを入れ替え、再度ボックスに一定時間閉じ込めた。これらの操作を 1 セッションとし、この条件づけを 3 セッション(day 1-3)繰り返した。条件づけ終了 24 時間後の day 4 および 96 時間後の day 7 に試験試行を行った。試験試行

では、動物に薬物および溶媒ともに投与せず、白・黒ボックスの滞在時間(15 分間)を測定した。データの解析は、薬物処置側ボックスの滞在時間から溶媒処置側ボックスの滞在時間を差し引いた値を CPP スコアとした。前試験法では薬物処置側のボックスにおける、条件づけの前と後の滞在時間の変化を計算し CPP スコアとした。これらの値がプラス(+)であれば、条件づけした薬物の報酬効果が発現し、マイナス(-)であれば薬物処置側のボックスからの回避行動すなわち嫌悪効果の発現として評価した。

2. ガラス玉覆い隠し試験

ガラス玉覆い隠し試験は、ラット用飼育ケージ(27×44×19 cm、幅×全長×高さ)を用いて、約 5 cm の深さで床敷きを敷き詰めた。ガラス玉が床敷きに埋もれないように上から押し固めた床敷き上に 25 個のガラス玉を均等に配し 30 分間自由に探索させた。投与 15 および 30 分後、真上から観察した時、2/3 以上床敷きが覆いかぶさっているガラス玉の数(number of buried marbles)を観察した。ガラス玉覆い隠し試験は、薬物の急性投与後および CPP 試験における day 4 および 7 の試験試行後に実施した。

3. 統計解析

すべてのデータは、In stat 3 for Windows (GraphPad) により解析した。行動薬理学的データは、平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) として表記し、統計学的有意差の評価は、Dunnet の多重比較検定を用いた。

C. 研究結果

1. 条件づけ場所嗜好性試験

条件づけ場所嗜好試験の結果、day 4 および 7 において U50,488H 1 mg/kg 投与群では、生理食塩液対照群と比較して有意な CPP スコアのマイナス (-)、すなわち嫌悪効果が認められた (Fig. 1)。また、day 4 において DOI 3 mg/kg 投与群では、生理食塩液対照群と比較して有意な CPP スコアのマイナス (-)、すなわち嫌悪効果が認められた (Fig. 2)。

2. ガラス玉覆い隠し試験

ガラス玉覆い隠し試験の結果、U50,488H 0.3、1 および 3 mg/kg 急性投与群においては、15 および 30 分後において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の低下が認められた (Fig. 3)。また、CPP 試験における day 4 の試験試行後に実施した本試験の結果、30 分後の U50,488H 1 mg/kg 投与群

において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の増加が認められた (Fig. 4)。DOI 0.3 および 1 mg/kg 急性投与群においては 15 分後に、1 および 3 mg/kg 投与群においては 30 分後において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の低下が認められた (Fig. 5)。また、CPP 試験における day 4 の試験試行後に実施した本試験の結果、15 分後の DOI 3 mg/kg 投与群、30 分後の DOI 1 および 3 mg/kg 投与群において生理食塩液対照群と比較して有意なガラス玉を隠した数の増加が認められた (Fig. 6)。

D. 考察

κ オピオイド受容体アゴニストであり、ヒトでの乱用もされているサルビノリン A (salvinorin A) は幻覚作用を発現することから指定薬物として規制されている¹⁾。 κ オピオイド受容体作動薬は、条件づけ場所嗜好性試験において一般的に嫌悪効果を示す^{2,3)}。他の先行研究同様に CPP 法において κ オピオイド受容体作動薬で嫌悪効果が認められている。 κ オピオイド受容体作動薬は、高用量投与では鎮静作用が認められる。U50,488H 10 mg/kg での条件づけで嫌悪効果の消失が認められたのはこの鎮静作用に起因すると考えられる。さらに、本研究では、5-HT₂ 受容体作動薬 DOI 誘発の嫌悪効

果を初めて捉えることに成功した。U50,488H および DOI による嫌悪効果は、幻覚発現薬の幻覚作用に起因していると考えられる。幻覚作用に起因すると考えられる嫌悪効果は、U50,488H では最終投与の 4 日後まで少なくとも持続していることが明らかとなった。一方、DOI では同様の嫌悪効果は認められなかったため、幻覚作用に起因した嫌悪効果は U50,488H の方が強度として強いことが考えられた。本試験を用いることで、嫌悪作用を指標とした幻覚発現薬の幻覚作用を定量化・数値化して評価可能であると考えられた。さらに、ガラス玉覆い隠し試験において κ オピオイド受容体作動薬 U50,488H 0.3-3 mg/kg の急性投与において情動異常を検出できた。この情動異常は、U50,488H による幻覚発現に起因することも考えられた。さらに、3 日間の投与の条件づけ終了 24 時間後の day 4 にも U50,488H 1 mg/kg 投与群で情動異常を検出できた。この情動異常は、複数回の U50,488H 投与による嫌悪効果を伴う幻覚発現が情動に影響を及ぼしたと考えられた。5-HT₂ 受容体作動薬 DOI 0.3-3 mg/kg の急性投与において情動異常を検出できた。この情動異常は、U50,488H と同様に幻覚発現に起因することも考えられた。さらに、3 日間の

投与の条件づけ終了 24 時間後の day 4 の DOI 1 および 3 mg/kg 投与群、さらに day 7 の DOI 3 mg/kg 投与群で情動異常を検出できた。この情動異常は、複数回の DOI 投与による嫌悪効果を伴う幻覚発現が情動に影響を及ぼしたと考えられた。幻覚作用に起因すると考えられる情動異常は、DOI では最終投与の 4 日後まで少なくとも持続していることが明らかとなった。情動面での影響は、U50,488H に比べ DOI の方がより強力であると考えられた。

本試験を用いることで、幻覚発現薬の幻覚発現に伴う情動異常が評価可能であると考えられた。

E. 結論

幻覚作用の客観的評価が困難な要因として、定量化・数値化が難しいことが考えられる。本研究では、幻覚発現薬と考えられる薬物において条件づけ場所嗜好性試験で嫌悪効果を認めた。この嫌悪効果は幻覚発現を比較的短期間となる計 5 日間で評価可能であり、かつ定量化・数値化できると考えられた。さらに、ガラス玉覆い隠し試験で情動異常を認めた。この情動異常は幻覚発現を定量化・数値化していると考えられた。これまでの研究成果も踏まえつつ、幻覚を評価するための現行法の

改良や新たな簡便で効率的な評価法の確立に向けて研究を進めていきたい。

F. 参考文献

- 1) Brito-da-Costa AM, Dias-da-Silva D, Gomes NGM, Dinis-Oliveira RJ, Madureira-Carvalho Á.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of salvinorin A and *salvia divinorum*: clinical and forensic aspects. *Pharmaceuticals* 14(2), 116, 2021.
- 2) Jay PM, Benjamin BL, Shuang L, John EP.: Charles Chavkin Prior activation of kappa opioid receptors by U50,488 mimics repeated forced swim stress to potentiate cocaine place preference conditioning. *Neuropsychopharmacology* 31(4), 787-794, 2006.
- 3) Ehrich JM, Messinger DI, Knakal CR, Kuhar JR, Schattauer SS, Bruchas MR, Zweifel LS, Kieffer BL, Phillips PE, Chavkin C.: Kappa opioid receptor-induced aversion requires p38 MAPK activation in VTA dopamine neurons. *J Neurosci.* 35(37), 12917-12931, 2015.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H, Kagaya H. A questionnaire-based study on the “Dame. Zettai. (Never. Ever.)” drug abuse prevention campaign and the medical use of narcotic agents. *Jpn J Pharm Palliat Care Sci.* (2022) 15: 121-128.
- 2) 鈴木 勉. 【別冊秋号オピオイド】(PART2) 基礎編 オピオイド身体依存のメカニズム. *LiSA 別冊.* (2022) 29別冊 165-168.
- 3) Mori T, Iwase Y, Uzawa N, Takahashi Y, Mochizuki A, Fukase M, Shibasaki M, Suzuki T. Synergistic effects of MDMA and ethanol on behavior: possible effects of ethanol on dopamine D₂-receptor-related signaling. (2021) *Addict Biol* e13000.
- 4) Mori T, Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T. Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice. (2021) *Behav Brain Res.* 396: 112802.

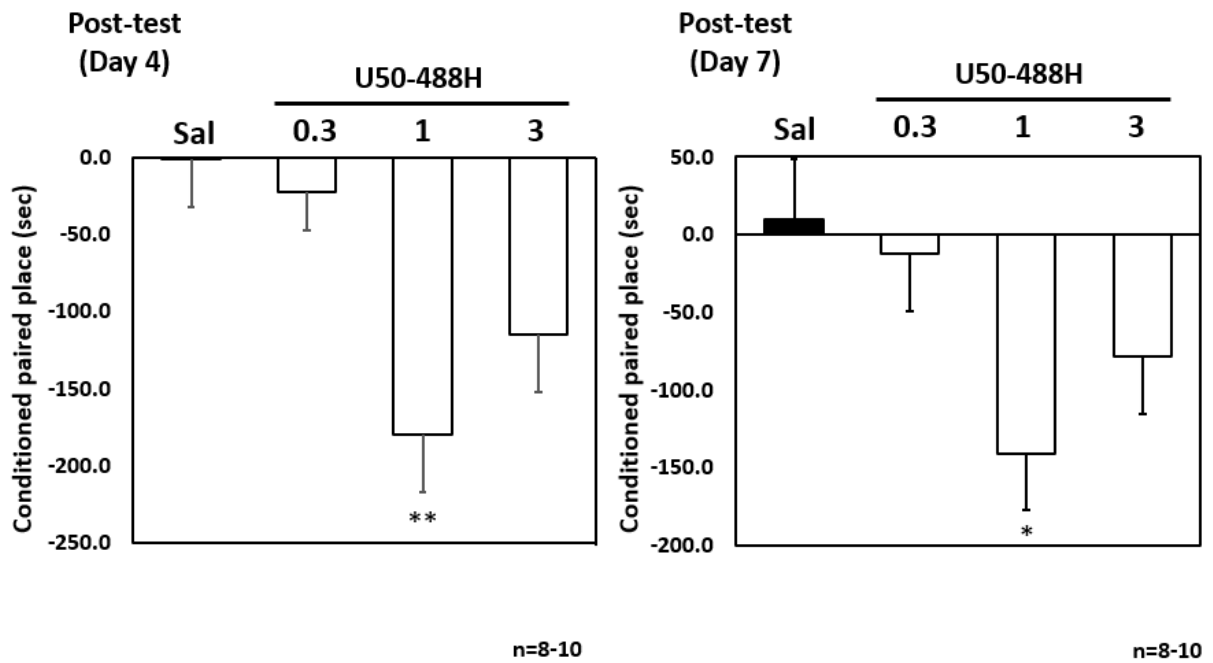
2. 学会発表

- 1) 鈴木 勉, 長谷川真司, 加賀谷肇:「ダメ。ゼッタイ。」普及運動は医療用麻薬の適正使用に影響しているか? : 日本薬学会第 114 年会 2024.3.28-31 (神奈川県横浜市)

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

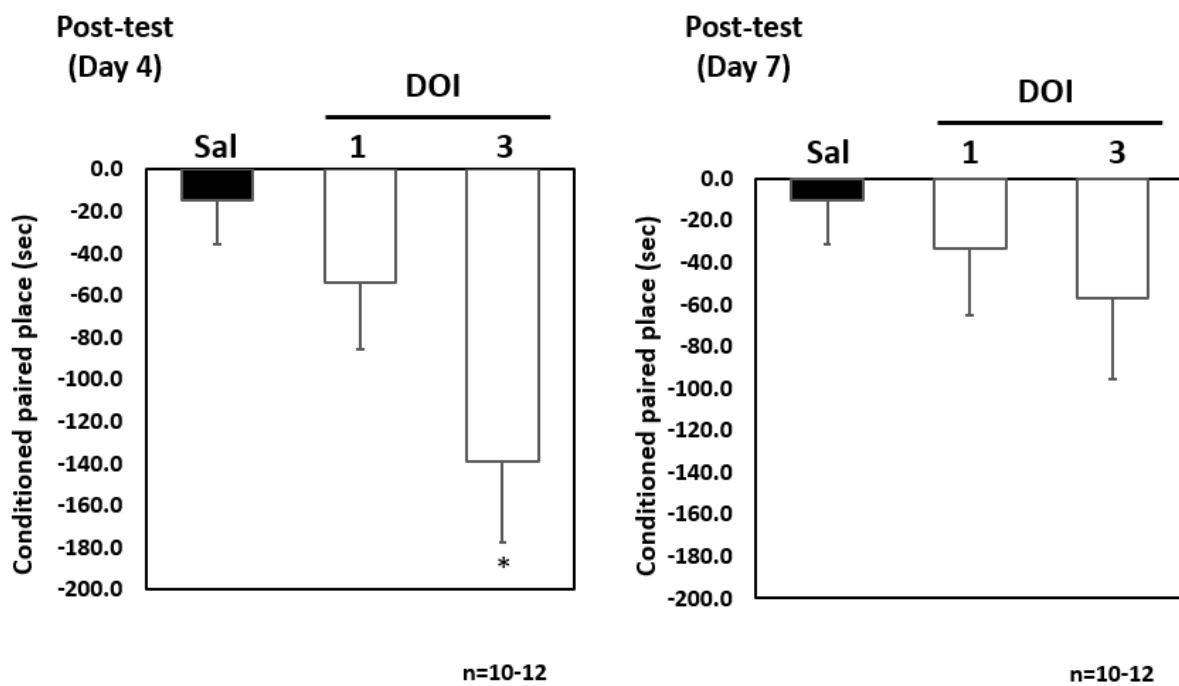
特になし



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 1

条件づけ場所嗜好性試験による U50-488H の評価



*: $p < 0.05$ vs control group (Dunnett's test)

Fig. 2

条件づけ場所嗜好性試験による DOI の評価

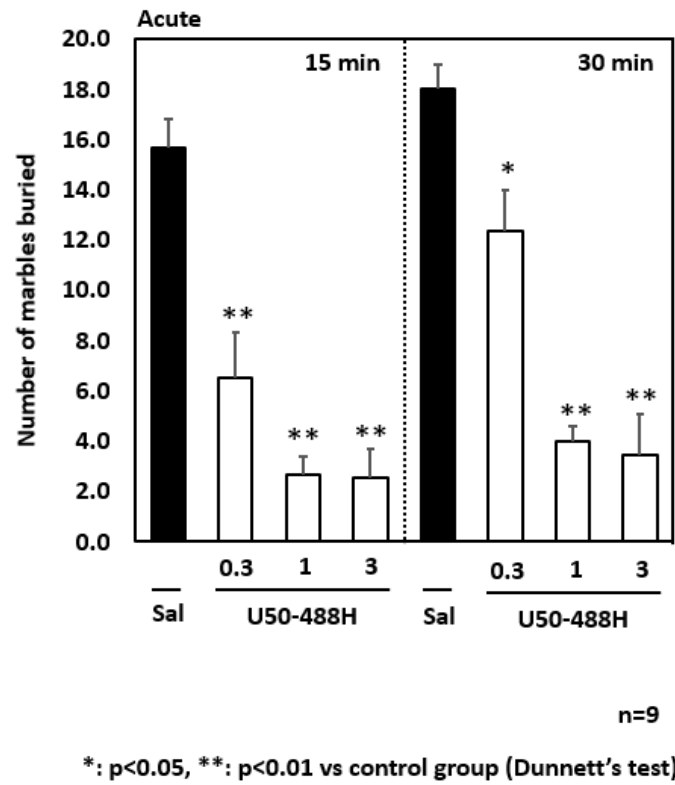


Fig. 3

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価 (急性投与)

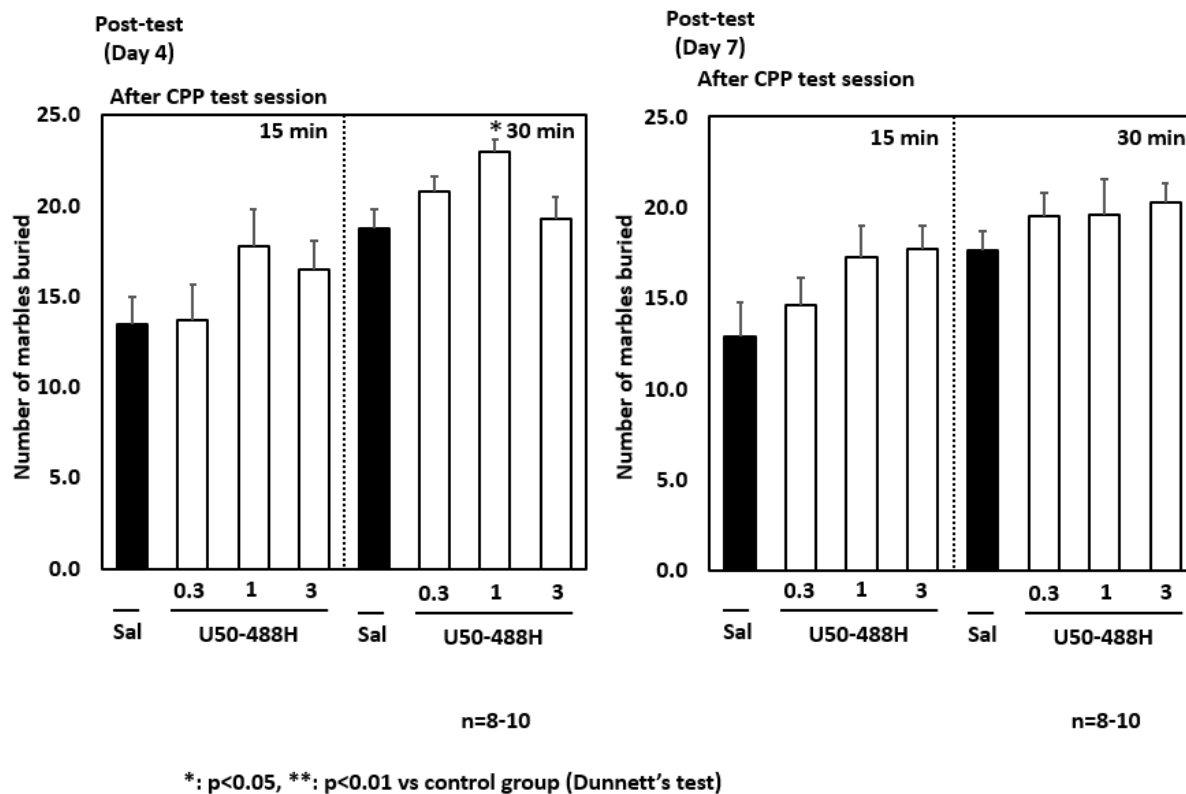


Fig. 4

ガラス玉覆い隠し試験による U50-488H の評価

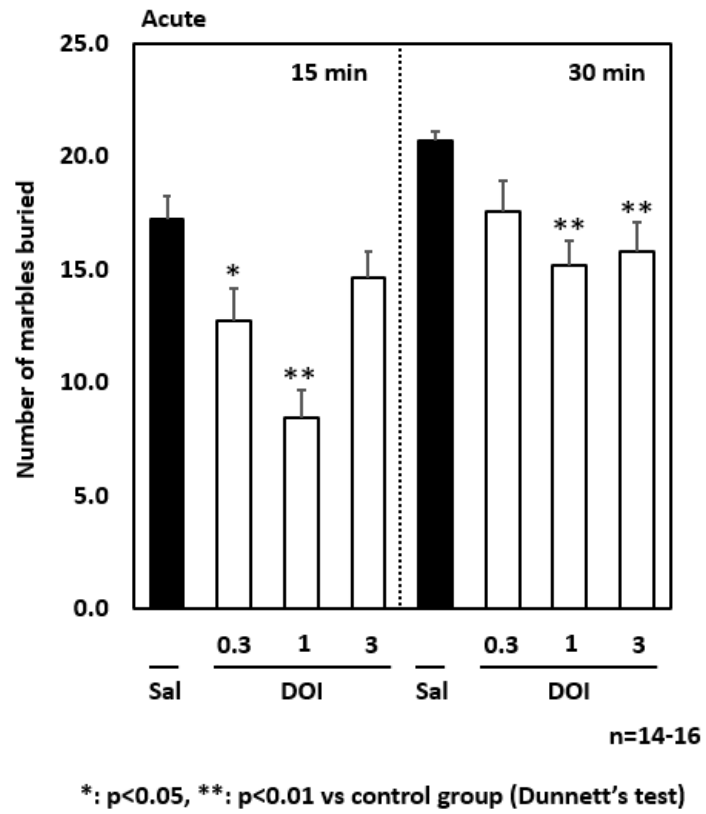


Fig. 5

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価 (急性投与)

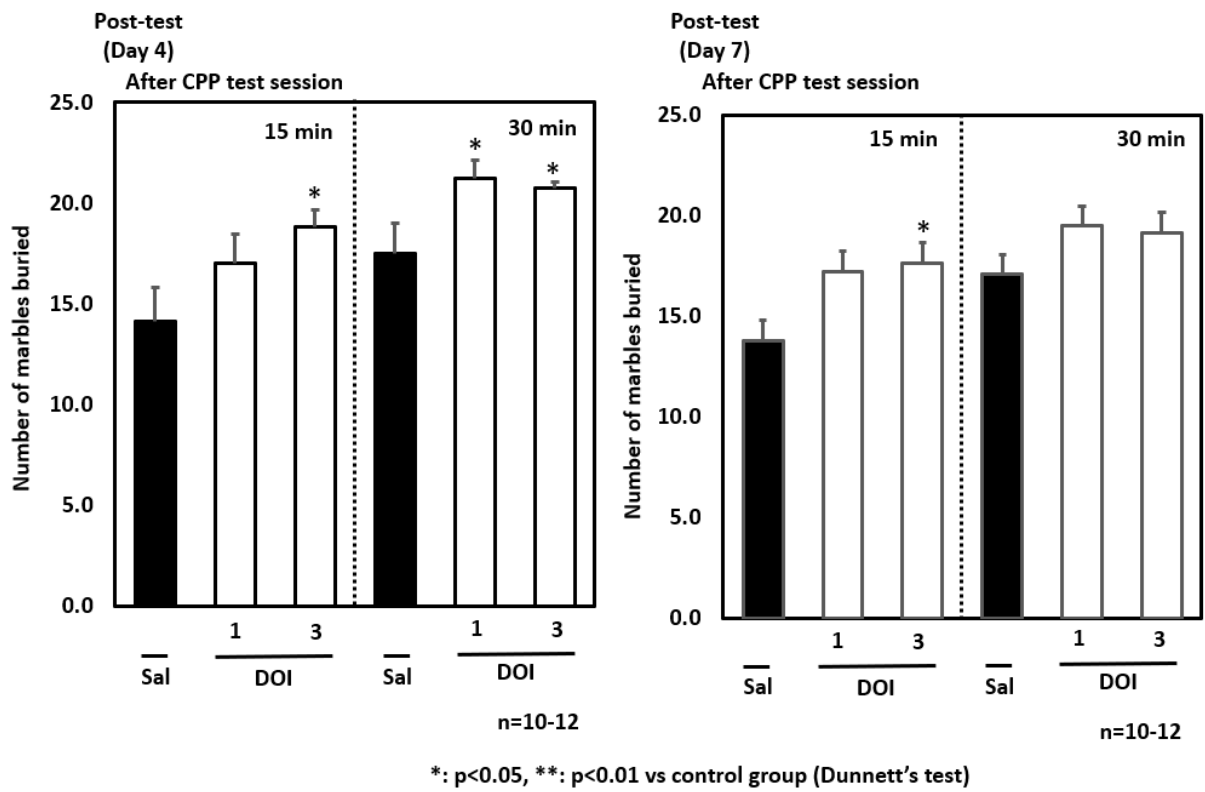


Fig. 6

ガラス玉覆い隠し試験による DOI の評価

令和5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)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

分 担 研 究 報 告 書

危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

分担研究者：船田正彦 湘南医療大学 薬学部

研究協力者：池上大悟 湘南医療大学 薬学部

【研究要旨】

未規制の乱用薬物である危険ドラッグには、幻覚作用を示す薬物が存在する。幻覚作用の評価方法は確立しておらず、法規制のためには正確に幻覚作用の評価を行うシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数の関係を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示唆されている。セロトニン受容体作用を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。HTR を定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。マグネットメーターは、ポリウレタン銅線を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。実験には、ICR 系マウスを使用した。マウスの頭蓋表面に強力な磁力を有するマグネットをデンタルセメントで留置して、装置内での HTR の動きで感知される電気信号を測定した。装置上部より、ビデオ撮影を行い、行動変化と電気信号の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。幻覚を誘発する薬物として、セロトニン 5-HT₂ 受容体作用薬の 4-Iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI)および選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体作用薬である 4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide (TCB-2)を使用した。DOI および TCB-2 投与後、HTR の特異的なシグナルの検出を行った。DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。DOI による HTR は選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬の(R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperinemethanol (MDL100907)により完全に抑制された。

以上の結果から、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。セロトニン受容体作用薬によるマウスの首振り反応の発現には、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆された。本解析手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

A. 研究目的

危険ドラッグとして合成カンナビノイド、カチノン系化合物、オピオイド化合物および催幻覚物質などが流通し、事件事故、健康被害が発生しており、世界的な問題となっている¹⁾。

催幻覚物質として、インドールアミン系とフェニルアルキルアミン系という 2 つの化学構造を有する化合物群が知られている。フェニルアルキルアミン系幻覚剤として、フェニルイソプロピルアミン (2,5-ジメトキシ-4-ヨードアンフェタミン (DOI)、2,5-ヨードアンフェタミン (DOI)、ジメトキシ-4-メチルアンフェタミン (DOM) などが流通している²⁾。こうした化合物群は、ラットやマウスの動物実験において、特徴的な首振り反応 Head Twitch Response (HTR)を示すことが報告されており、幻覚作用を反映する行動モデルとして注目されている^{3,4)}。

幻覚作用を示す危険ドラッグの法規制のためには、幻覚作用を適切に評価するためのシステム構築が急務である。これまでの研究では、幻覚作用を示すセロトニン受容体作用薬において、マウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)の出現が確認されており、幻覚作用が強い薬物と HTR の回数との関係を調べることで、幻覚作用の発現予測ができることが示

唆されている^{3,4)}。セロトニン受容体作用を示す危険ドラッグは多数存在することから、ハイスループットで幻覚作用を予測する手法の確立が望まれる。

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTR を定量化できる自動測定装置の開発を試みた。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (Jcl、25 - 30g、日本クレア) を使用した。

使用薬物：セロトニン 5-HT₂ 作用薬である 4-Iodo-2,5-dimethoxy- α -methylbenzeneethanamine (DOI, Sigma-Aldrich) および選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体作用薬である 4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide (TCB-2, Tocris) を使用した。また、選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬としては (R)-(+)- α -(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-[2-(4-fluorophenyl)ethyl]-4-piperinemethanol (MDL100907, Tocris) を使用した。

1. マグネットメーターの作製

マグネットメーターは、ポリウレタン銅線

(絶縁部含めて 0.26mm 径銅線) を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。装置内の磁石の動きにより誘発される電気信号を PowerLab 26T (AD INSTRUMENTS、U.S.A.)により検出し、LabChart(LCS100/8、(AD INSTRUMENTS、U.S.A.)を使用して解析した(Fig. 1)。

2. マウス首振り反応の検出

マウスの頭蓋表面にネオジウム磁石 (4mm X 4mm X 2mm, 375mg) をデンタルセメントで留置した。1 週間の回復を待って、マウスをマグネットメーター内に入れ、装置内でのマウス首振り反応(HTR)の動きで感知される磁力変化を測定した。

ビデオ解析: ビデオカメラ (Handycam, Sony, 4K FDR-AX60)にて行動変化を録画し、首振り反応の出現を解析した。

幻覚を誘発する薬物として、DOI を使用した。装置上部より、ビデオ撮影を行い、行動変化と磁力変化の相関性を確認しながら、HTR に特異的な信号を選択した。同様に、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用薬 TCB-2 の効果も測定した。

3. 統計解析

全てのデータは、Prism 7 for Mac OS X により解析した。行動薬理学的データおよび電気信号の解析データは一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、ポストホックテストとして Dunnett's multiple comparison test により比較した。

C. 研究結果

1. マグネットメーターの作製

マウスの頭蓋表面にネオジウム磁石を留置したマウスに DOI(1)を投与し、装置内へ入れると、一定の振幅の中に鋭いスパイク信号が確認された(Fig. 2A)。鋭いスパイク信号が確認された部分では、マウスは頭部を高速で振る行動が発現していた。そこで、ビデオによる行動変化と電気信号として得られる波形から、HTR に関連する電気信号のみを抽出する条件設定として、適切なフィルター処置条件を検討した(Fig. 2B)。その結果、行動変化から得られる電気信号の波形について、40-200Hz のフィルター処理を行うことで、HTR の特異的なシグナルとして分離できることが明らかになった(Fig. 2C)。

2. マウス首振り反応の検出

マグネットメーターの使用 (40-200Hz のフィルター処理) で、DOI 投与後、多数の HTR の発現を確認することが可能であった。また、DOI の用量依存的な HTR の発現が確認された(Fig. 3)。同様に、セロトニン 5HT_{2A} 受容体作用薬 TCB-2 投与においても、HTR の特異的なシグナルを分離することが可能であった(Fig. 3)。設定条件では、DOI および TCB-2 投与により用量依存的な HTR の発現が確認された。これらの効果は、選択的セロトニン 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬である MDL100907 の前処置により完全に抑制された(Fig. 4)。

D. 考察

本研究では、幻覚を示すとされる危険ドラッグによって誘発されるマウスの首振り反応 Head Twitch Response (HTR)に着目して、HTRを定量化できる自動測定装置の開発を試みた。HTRを定量化する目的で、磁石の動きを検知することができる磁力測定装置として、マグネットメーターを作製した。

マグネットメーターとして、ポリウレタン銅線のコイルを作製し、直径15cmの円筒ビーカーに装着した。マウスの頭蓋表面にネオジウム磁石を留置したマウスにDOIを投与し、装置内へ入れると、一定の振幅の中に鋭いスパイク信号が確認された。鋭いスパイク信号が確認される部分では、マウスは頭部を高速で振る行動が発現していた。ビデオによる行動変化と電気信号として得られる波形を比較検討することにより、40-200Hzのフィルター処理を行うことで、HTRの特異的なシグナルとして分離できることが明らかになった。幻覚を誘発する薬物として、セロトニン5-HT₂作用薬であるDOI投与後、ビデオによる行動変化と電気信号として得られる波形から、HTRの特異的なシグナルを分離することが可能であった。設定条件では、DOI投与により用量依存的なHTRの発現が確認された。以上の結果から、本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。

ヒトにおける幻覚作用とHTRの関連性から、HTRは、5-HT_{2A}受容体作用薬による幻覚作用を反映する行動指標の一つとして注目されて

いる^{5,6,7,8}。本結果からも、セロトニン5HT_{2A}受容体作用薬TCB-2¹⁰においてHTR発現が確認されたことから、セロトニン5-HT_{2A}受容体がHTR発現に関与することが明らかになった。

一方、セロトニン系化合物以外の催幻覚薬ではHTRの発現が認められないため、HTRの幻覚作用のモデルとしての価値は限定的と考察されている⁹。セロトニン系化合物については、マウスを用いたHTRアッセイを、ヒトにおける幻覚作用を予測するための前臨床モデルとして用いることが可能であると考えられる。

本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

E. 結論

本研究で作製した磁力測定装置により、マウスの首振り反応の発現回数を定量的に解析することが可能になった。本装置を利用して、危険ドラッグが示すマウスの首振り反応を指標に、幻覚作用の発現強度を推測できることが期待される。本手法は自動測定が可能であることから、危険ドラッグの催幻覚作用を迅速に予測する手法として、有用であると考えられる。

F. 参考文献

- 1) United Nations Office on Drugs and Crime, Early Warning Advisory on NPS, 2022.

- <https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/Details/275dd468-75a3-4609-9e96-cc5a2f0da467>
- 2) Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004; 101:131–181. [PubMed: 14761703]
 - 3) Halberstadt AL, Geyer MA. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology.* 2011; 61:364–381. [PubMed: 21256140]
 - 4) Canal CE, Morgan D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug Test Anal.* 2012 Jul-Aug;4(7-8):556-76. doi: 10.1002/dta.1333. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22517680; PMCID: PMC3722587.
 - 5) González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q, Sealfon SC, Gingrich JA. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* 2007 Feb 1;53(3):439-52. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.008. PMID: 17270739.
 - 6) Halberstadt AL, Geyer MA. Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice: detection of the behavior based on the dynamics of head movement. *Psychopharmacology (Berl).* 2013 Jun;227(4):727-39. doi: 10.1007/s00213-013-3006-z. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23407781; PMCID: PMC3866102.
 - 7) Halberstadt AL, Geyer MA. Effects of the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I) and superpotent N-benzyl derivatives on the head twitch response. *Neuropharmacology.* 2014 Feb;77:200-7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.025. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012658; PMCID: PMC3866097.
 - 8) Halberstadt AL, Chatha M, Klein AK, Wallach J, Brandt SD. Correlation between the potency of hallucinogens in the mouse head-twitch response assay and their behavioral and subjective effects in other species. *Neuropharmacology.* 2020 May 1;167:107933. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019. 107933. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31917152; PMCID: PMC9191653.
 - 9) Canal CE, Morgan D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug Test Anal.* 2012 Jul-Aug;4(7-8):556-76. doi: 10.1002/dta.1333. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22517680; PMCID: PMC3722587.
 - 10) McLean TH, Parrish JC, Braden MR, Marona-Lewicka D, Gallardo-Godoy A, Nichols DE. 1-Aminomethylbenzocycloalkanes: conformationally restricted hallucinogenic phenethylamine analogues as functionally selective 5-HT2A receptor agonists. *J Med Chem.* 2006 Sep 21;49(19):5794-803. doi: 10.1021/jm060656o. PMID: 16970404.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 船田正彦:海外の大麻規制変遷から考える

国内の大麻規制再構築の意義. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 54: 36-42, 2023.

2. 学会発表

- 1) 船田正彦. 危険ドラッグの有害作用の評価と包括規制に関する研究. 第 53 回日本神経精神薬理学会年会 シンポジウム(東京、2023 年 7 月 21 日)
- 2) 船田正彦. 米国におけるオピオイド乱用・依存問題の現状. 2023 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (岡山、2023 年 10 月 14 日)
- 3) Tsukasa Tomizawa, Shuntaro Kikukawa, Hironobu Arita, Kayo Nakamura, Kosho Makino, Hidetsugu Tabata, Tetsuta Oshitari, Hideaki Natsugari, Masahiko Funada, Hideyo Takahashi. Synthesis and Structure-Activity Relationship of Opioid μ -Receptor Antagonists The 11th Asian Association of Schools of Pharmacy (AASP) Conference (in Macao) Aug. 2023.
- 4) 菊川俊太郎、有田浩暢、富澤宰、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、富山健一、高橋秀依「フェンタニル骨格に由来する新規オピオイド μ 受

容体アンタゴニストの創製」第 84 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(東京、2023 年 5 月)

- 5) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の構造活性相関」日本薬学会 第 143 年会 (札幌、2023 年 3 月)
- 6) 富澤宰、菊川俊太郎、有田浩暢、中村佳代、牧野宏章、田畑英嗣、忍足鉄太、夏苺英昭、船田正彦、高橋秀依「フェンタニル誘導体の合成と構造活性相関」第 66 回日本薬学会関東支部大会 (横浜、2022 年 9 月)

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

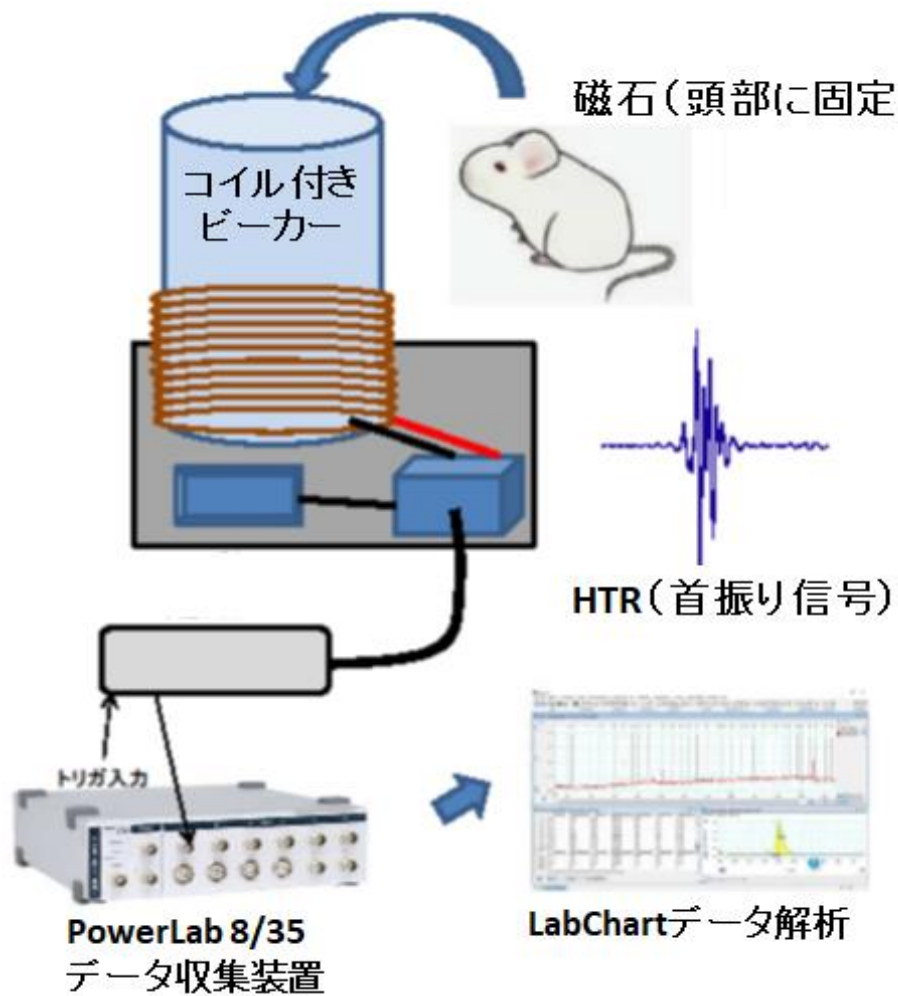


Fig. 1. マグネットメーター

銅線コイルを巻いた円筒状の磁力測定装置を作製した。ポリウレタン銅線（絶縁部含めて 0.26mm 径銅線）を使用して、直径 16cm のコイルを作製し、直径 15cm の円筒ビーカーに装着した。麻酔下、頭蓋部へネオジウム磁石(4mm X 4mm X 2mm, 375mg) をデンタルセメントにて固定し 1 週間の回復を待って、行動変化を測定した。

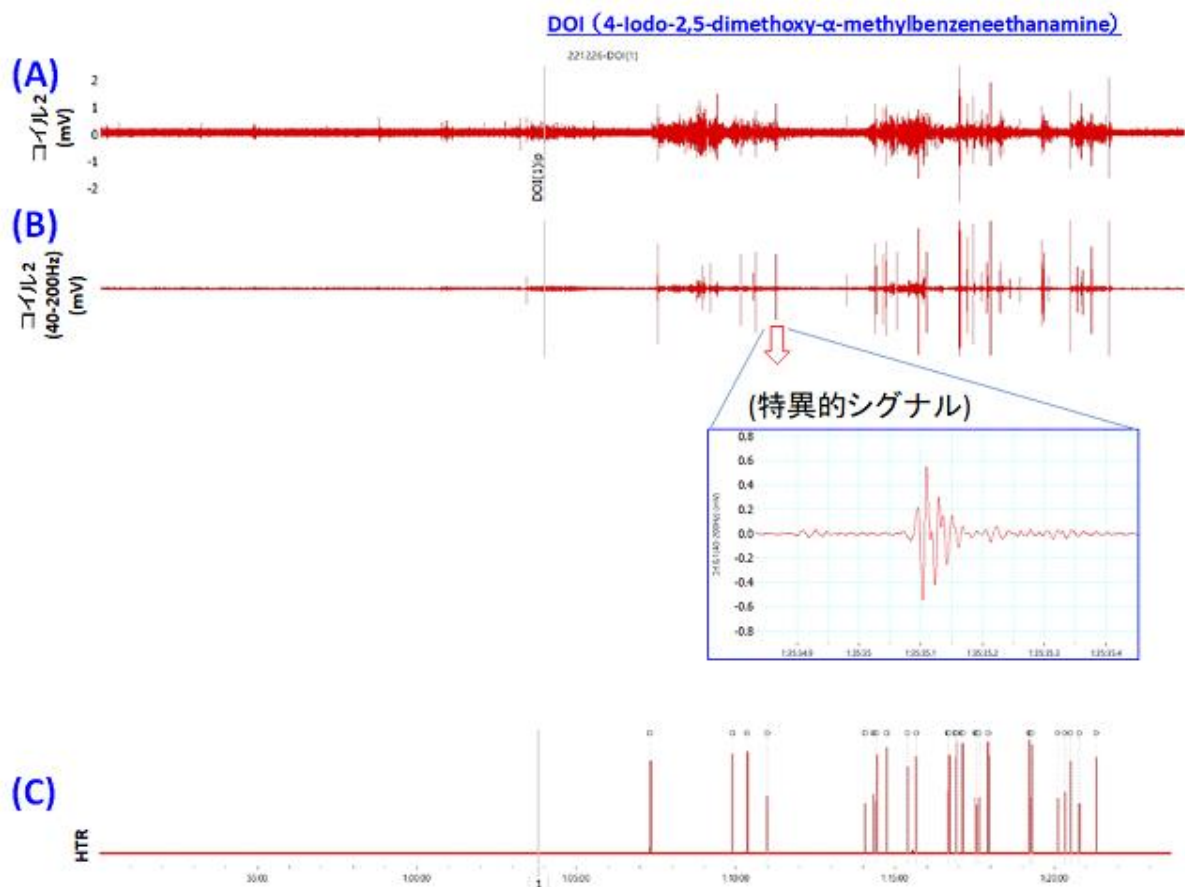


Fig. 2. マウス首振り反応の解析

(A) マウスの行動変化により、磁力変化が検出された

(B) ビデオ解析とフィルター処理により、特異的な定量的測定が可能になった。

◎40-200Hz のフィルター処理＝特異的なシグナルとして、波形の特徴を確認

(C) ○印：首振り反応(HTR)

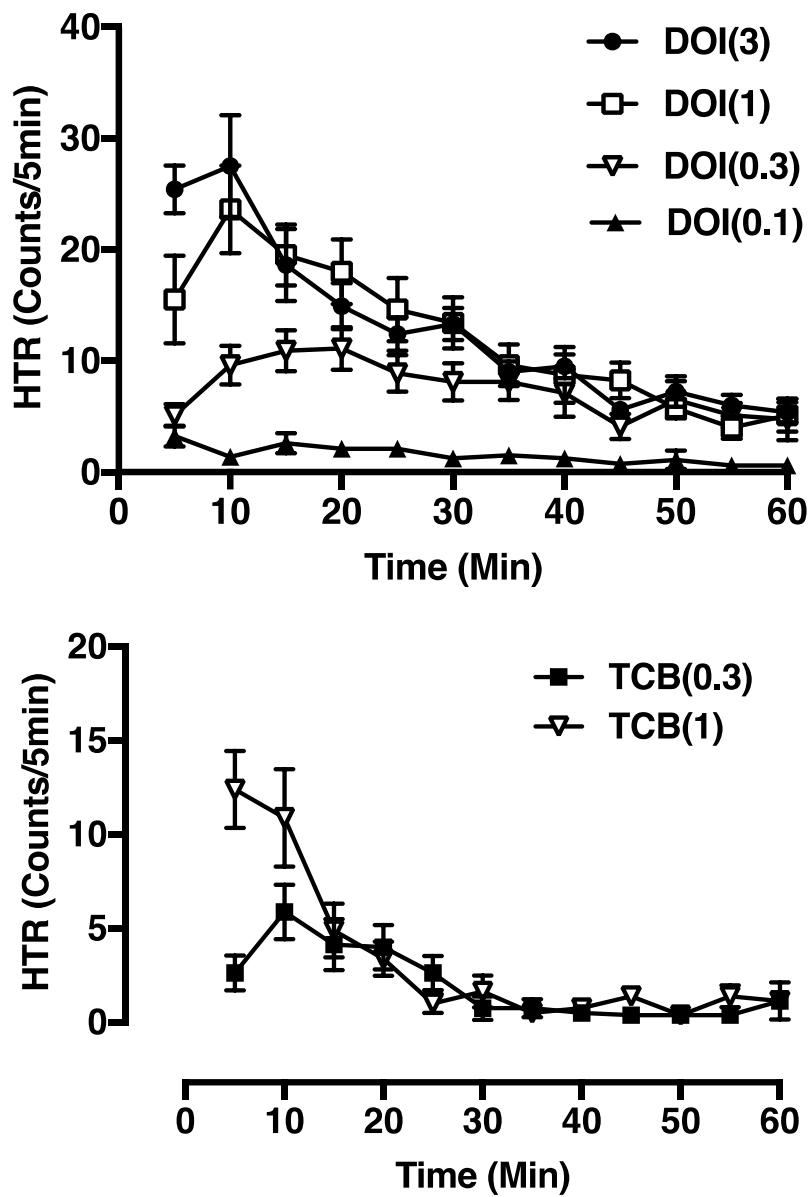


Fig. 3. セロトニン作用薬による首振り反応
 DOI (0.1-3 mg/kg), TCB-2 (0.1-3 mg/kg)による首振り反応(HTR) 5分ごとの行動変化

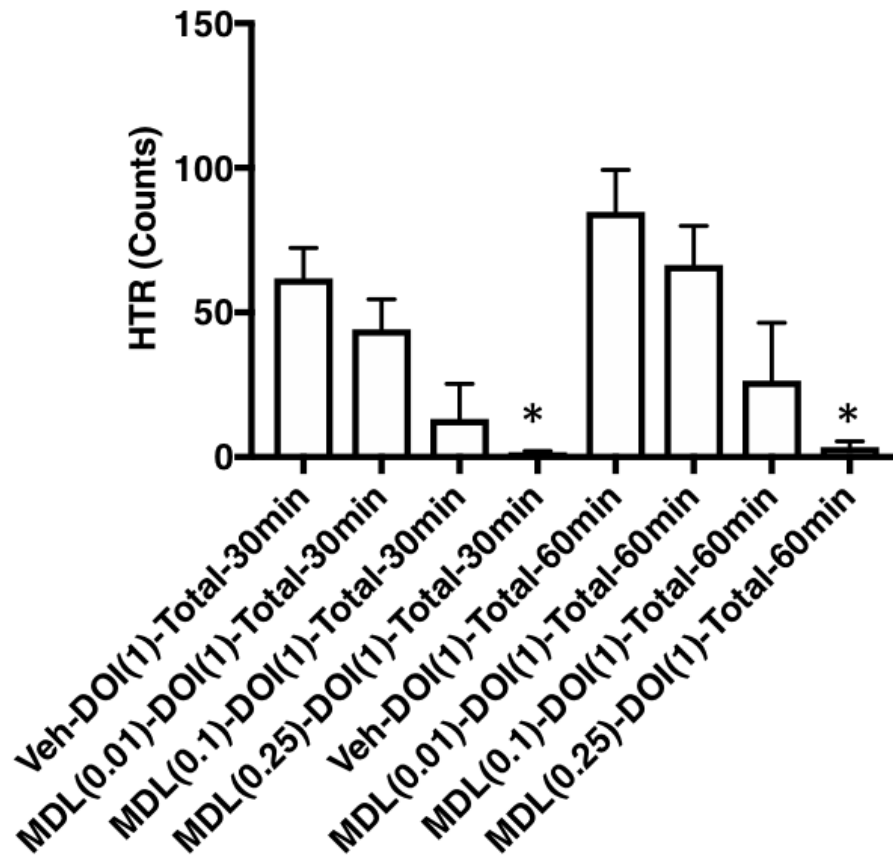


Fig. 4. セロトニン受容体の役割
 DOI (1 mg/kg)による首振り反応(HTR) に対するセロトニン 5HT2A 受容体拮抗薬 MDL100907 の影響.

令和5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)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

分担研究報告書

幻覚作用を有する薬物の合成

分担研究者：栗原正明 湘南医療大学 薬学部
協力研究者：市丸 嘉 湘南医療大学 薬学部

【研究要旨】

[緒言] 幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。

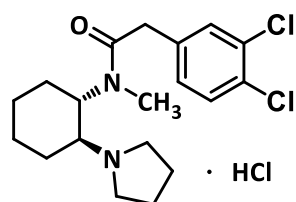
[結果] セロトニン受容体に作用する化合物 U50,488 の合成を行った。

[考察] 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、トータル収率約 20%で U50,488 を合成することができた。次に光学活性体の合成を行いたい。

A. 研究目的

危険ドラッグが依然として大きな社会問題となっている。それに伴い、危険ドラッグの速やかな規制が求められており、そのための迅速な評価法開発が急務となっている。評価法の検討には、使用する化合物の供給が必要不可欠である。本研究では幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行うことを目的とする。

合成した化合物は幻覚作用を評価する試験法の開発に供する。



(±)-U50,488H

Fig. 1

B. 研究方法

参考文献 1,2)に従って U50,488 の合成を行った。出発原料として 7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を用いた。

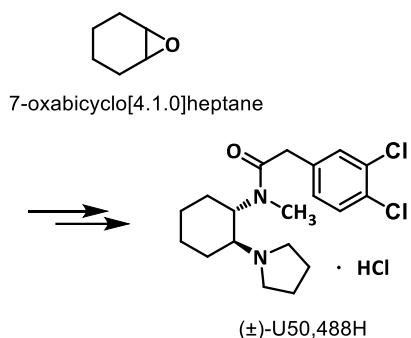


Fig. 2

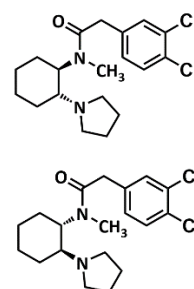


Fig. 3

C. 研究結果

7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、トータル収率約 20%で U50,488 を合成することができた。(Fig. 3)

X 線構造解析により構造を確認した。(Fig. 4) 合成した U50,488 は塩酸塩として、評価を行う各分担研究者に供した。

D. 考察

U50,488 はキラルな分子であるので、鏡像体間で生物活性が違うことが予測される。光学活性な U50,488 を合成することは重要なことと考えられるので、光学活性を得る方法の検討を行うことを考えたい。

E. 結論

7-oxabicyclo[4.1.0]heptane を出発原料として、6 段階でトータル収率約 20%で U50,488 を合成した。合成した U50,488 は塩酸塩として、評価を行う各分担研究者に供した。

今後も、幻覚作用を有すると考えられるセロトニン受容体に作用する化合物の合成を行う。

F. 参考文献

- 1) J. González-Sabín, et al., *Chem. Eur. J.*, 2004, 10, 5788–5794.
- 2) P.L. Chesis and M.J. Welch, *Appl. Radiat. Isot.*, 1990, 41, 267–273.

G. 研究発表

1. 論文発表

2) Moriya S, Funaki K, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T.: Synthesis and properties of PNA containing a dicationic nucleobase based on N4-benzoylated cytosine.: *Bioorg Med Chem Lett.* 2023 May 15;88:129287.

3) Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.: Bis(nitrato- κ O)(1,4,8,11-tetra-aza-cyclo-tetra-decane- κ 4 N)zinc(II) methanol monosolvate.: *IUCrdata.* 2022 Aug 31;7(Pt 8):x220854.

4) Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, Kurihara M, Kittaka A, Sugiyama T:
PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA: *Peptide Science 2021, 2022*, 111-112

2. 学会発表

1) 大環状ポリアミン-亜鉛錯体の単結晶 X

線結晶構造解析：市丸 嘉、加藤 紘一、小池 透、黒崎 博雅、栗原 正明：日本薬学会第 143 年会（2023/03）

2) 市丸嘉, 加藤紘一, 栗原正明, 黒崎博雅：アントラセンを導入した Bis(2-picoyl)amine 誘導体-亜鉛錯体の DNA 光切断活性：第 67 回日本薬学会関東支部大会（2023/9/16, 東京）

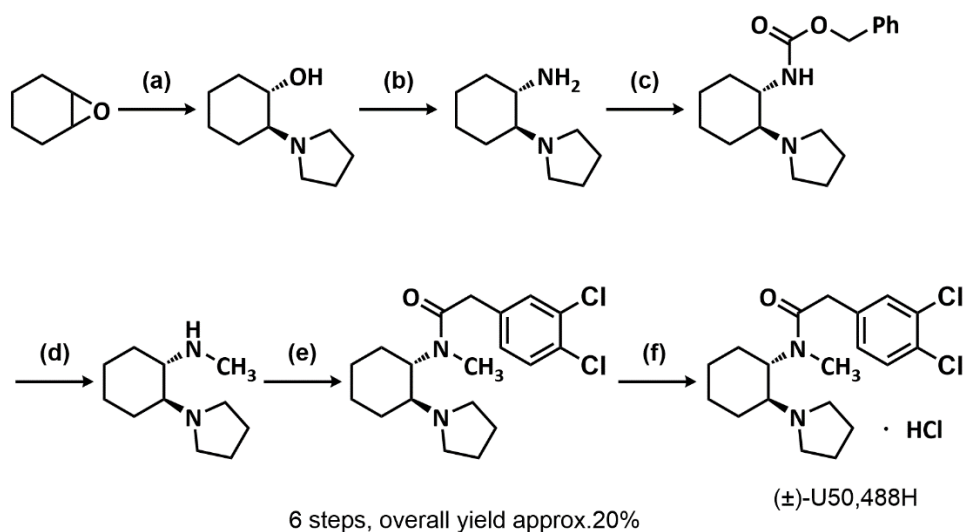
3) Shun-suke Moriya, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Strand invasion by PNA containing preQ1: 第 50 回国際核酸化学シンポジウム（2023/11/1-3）宮崎

4) Shun-suke Moriya, Mai Kiyosue, Yosuke Demizu, Masaaki Kurihara, Atsushi Kittaka, Toru Sugiyama: Properties of peptide nucleic acid containing n4 - bis(aminomethyl)-benzoylated cytosine for enhanced DNA binding: 第 60 回ペプチド討論会（2023/11/8-10）滋賀

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

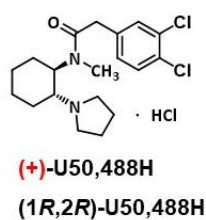
特になし



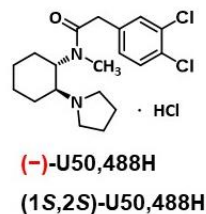
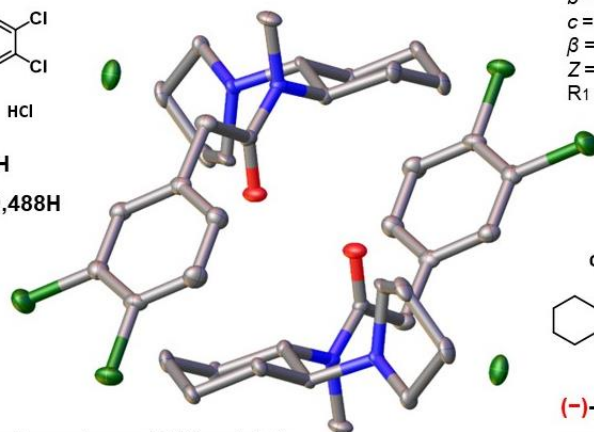
- (a) Pyrrolidine, C₂H₅OH, reflux, 16 h, 75–85%
 (b) CH₃SO₂Cl, triethylamine (TEA), aq NH₃, 0oC to r.t., 16 h, quant
 (c) Cbz-Cl, TEA, 0oC to r.t., 5 h, 60–75%
 (d) LiAlH₄, THF, r.t., 16 h, quant
 (e) 1,1'-Carbonyldiimidazole, THF, r.t., 4 h, 40–50%
 (f) HCl, ethanol, r.t., 5 min, quant

Fig. 4

合成した(±)-U50,488Hの単結晶X線構造解析(XRD)



Space group: *P21/n*
 C₁₉H₂₆Cl₂N₂O · HCl · CH₃OH
a = 8.77080(10) Å
b = 18.5599(2) Å
c = 13.6323(2) Å
 β = 105.012(2)°
 Z = 4
 R₁ = 5.41%, wR₂ = 15.88%



The thermal ellipsoids are drawn at 50% probability.
 All hydrogen atoms and solvate CH₃OH are omitted for clarity.

Fig 4 合成した(±)-U50,488Hの単結晶X線構造解析(XRD)

Fig. 5

令和4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)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

分担研究報告書

摂取感覚および行動パターン解析による薬物乱用の評価

分担研究者：森 友久 星薬科大学 薬学部

【研究要旨】

乱用が問題となる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚を有し、自発運動を強く亢進させるとされてきた。そのため乱用に関する蓋然性評価において、精神刺激薬様の摂取感覚あるいは自発運動促進効果が蓋然性評価の指標とされてきた。しかしながら我々の近年の研究では、いくつかの幻覚を発現するカチノン系薬物では、こうした相関が認められず、これらの結果は、指定薬物の指定に係る試験法として、少なくとも1つの指標による評価では、十分な評価が難しいことを示唆している。本分担研究課題では、様々なタイプの幻覚誘発薬によって引き起こされる行動変化を評価しうる系の構築を目指すため、本年度は、構造変換が容易な phenylpiperadine 誘導体に着目し、解析法について検討することとした。そこで、1-(3-trifluoromethylphenyl)piperadine (TFMPP)、1-(3-chlorophenyl)-piperadine (3-CPP) および phenylpiperadine による MDMA の弁別刺激効果に対する般化試験、さらにこれらの自発運動に及ぼす影響を検討した。その結果、phenylpiperadine および 3-CPP は MDMA 様の弁別刺激効果を示したものの、TFMPP は般化しかなかった。一方、自発運動の測定において、TFMPP は運動亢進を示したものの、phenylpiperadine および 3-CPP は自発運動に影響を及ぼさなかった。このように phenylpiperadine 構造を有する薬物においても精神刺激薬様の摂取感覚を持つにも関わらず、自発運動に影響を及ぼさない薬物が確認され、蓋然性評価系において、少なくともいくつかの評価系の組み合わせることが重要であると確認された。今後は、乱用が懸念される NMDA-遮断薬および κ -受容体作動薬の乱用予測のための評価系について検討していくこととし、現在、弁別刺激効果ならびに自発運動の測定に着手している。

A. 研究目的

依存形成薬物には独特な感覚効果、即ち自覚効果があり、これを求めて精神依存が引き起こされ、乱用される。この薬物を摂取した時の感覚効果を動物において判別する試験法としては薬物弁別法が古くから用いられてきている。薬物弁別法ではヒトにおいて摂取した薬物により誘発される自覚効果を動物における弁別刺激効果と定義し、薬物の摂取感覚効果の類似性の証明や作用機序を解明することが可能となる。近年問題となってきた危険ドラッグは、幻覚作用をはじめとする自覚効果を引き起こすとされている。また、危険ドラッグを含めて多くの薬物は、自発運動に影響を及ぼすことも知られている。

近年社会問題となった危険ドラッグの乱用は、法の網をくぐり抜けるため既知の骨格に対して様々な修飾がなされた薬物が流通し、社会問題となってきた。こうした問題に対して、多くの危険ドラッグの共通構造であるカチノンあるいはカンナビノイド系の骨格に対する包括規制により危険ドラッグの乱用問題は鎮静化がなされてきている。しかしながら、これまでに乱用が問題となった機

序を有する別の骨格、あるいは諸外国で乱用が問題となってきたペペリジン系薬物、NMDA 受容体遮断薬あるいはオピオイド受容体作動薬の類自体の乱用問題に備える必要が出てきている。一方で、新たなタイプの危険ドラッグが出現した場合に、これらを評価する評価系の構築が十分ではないのが現状である。そこで、摂取感覚および行動変化による薬物乱用の評価による蓋然性評価のための評価系を検討することとした。

B. 実験方法

薬物弁別法

1. 実験動物及び飼育条件

Fischer 344 系雄性ラット (オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を用いた。この動物は恒温恒湿室 (23±1 °C、55±5 %) においてプラスチックゲージ内で飼育し、8:00 点灯、20:00 消灯の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお、薬物弁別法で使用したラットについては、体重が 230 g 程度になるよう摂餌制限を行った。なお飲水 (水道水) は自由とした。

2. 弁別装置

実験には、オペラントボックス (model GT8810、小原医科産業株式会社、東京) を使用した。オペラントボックス内の床はグリットとし、ボックス内には左右に 2 つのレバーを設置し、左右のレバーの間に強化子の給仕皿

が1つ設置されているものを使用した。また、強化子として精密錠剤型飼料 (20 mg; 小原医科産業株式会社、東京) を用いた。

3. 弁別訓練

MDMA、U50,488H あるいは quinpirole と vehicle との弁別訓練を開始する前に、すべてのラットにレバー押し訓練を行った。レバー押し訓練には左右どちらかのレバーが提示され、LLRLLRR (L= 左、R= 右) の順序でまず Fixed Ratio (FR) 1 強化スケジュールでレバー押し訓練を行った。また、1 セッションは 15 分とし、レバーを押すと強化子が与えられるスケジュールを用いた。1 セッションのレバー押し回数が 40 回に達した時点で FR1 におけるレバー押しが確立されたものとし、徐々に FR2、FR4、FR6、FR8、さらに FR10 へと増加させた。

FR10 での反応率 (response rate) が安定した後、薬物と vehicle との弁別訓練を FR10 スケジュールで行った。弁別訓練では 1 セッションを 15 分間とし、弁別訓練開始 30 分前に 薬物または vehicle を皮下投与した。各セッションの投与順序は DDVV... (D=薬物、V=Vehicle) とし、薬物もしくは溶媒投与時の左右のレバーの選択は、動物の嗜好性による片寄り (ばらつき) を避けるためにカウンターバランス法 (L=D、R=V の対応と L=V、R=D の対応の装置をそれぞれ 2 組用意した) を使用した。弁別獲得の基準は、最初の強化子を得るためのレバー押しの回数を First Food Pellet (FFP) として測定し、訓練において 5 日間連続して $FFP \leq 12$ (正反応率 83% 以上) となった場合を弁別獲得とし、弁

別訓練は弁別獲得後も継続した。

4. 般化試験

般化試験は、薬物およびその溶媒の弁別獲得後、弁別訓練を継続しながら 3 日間連続して $FFP \leq 12$ を達成した際に行った。テストセッションは、ラットがオペラントボックス内の左右いずれかのレバーを合計 10 回押した時点で終了とした。また、セッション開始から 15 分が経過した時点で 10 回のレバー押し反応を認めなかった場合は反応が崩壊したと判断し、セッションを終了した。

統計解析

実験における測定値は、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) として表示した。テストセッションにおいては、総レバー押し回数に対する薬物側レバー押し回数の割合 (%) で求めた。訓練薬物の弁別刺激効果に対し、80% を超えて薬物側レバー押し反応を示したものを般化とし、50-79% の範囲を部分般化とし、50% を下回る薬物側レバー押し反応を示したものを般化しなかったと判断した。また、反応率 (response rate) はレバーを問わず、10 回反応するまでの時間を 1 分間あたりのレバー押し回数に換算して求めた。自発運動量における統計解析には、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) として表記し、統計学的有意差の評価は、Two-way ANOVA によって解析した後は、Bonferroni test に従って post-hoc test によって行った。

C. 結果

1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine(TFMPP) および 1-(3-chlorophenyl)-piperidine (3-CPP) を用いて MDMA の弁別刺激効果に対する般化試験を行ったところ、前年度、3-CPP は MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示し、TFMPP は般化を示さなかったことから、本年度はさらに phenylpiperadine による般化試験を行った。その結果、phenylpiperadine は、MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示した(図 1)。これらの結果が自発運動量変化に相関するか否かについて検討したところ、MDMA の弁別刺激効果に般化を示した 3-CPP および phenylpiperadine では自発運動の亢進作用を示さなかったものの、TFMPP では弱いながらも自発運動亢進作用を示した(図 1)。

NMDA 拮抗薬についての蓋然性評価を行うための系の構築のために ketamine を用いて行動評価を行った。Ketamine は、5-20mg/kg の範囲で用量依存的な自発運動亢進作用が認められた。Ketamine (10 mg/kg)により発現する自発運動促進効果の機序を解析するために、prepro-enkephalin 欠損マウスを用いて C57BL/6J マウスの運動量と比較検討したところ、prepro-enkephalin 欠損マウスにおいて自発運動の有意な低値が確認された。本研究結果を受容体レベルで検討するために、各選択的受容体拮抗薬について検討したところ、naloxone (1 mg/kg) は影響を与えずに naltrindole は、ketamine により誘発される自発運動促進効果を有意に抑制した。さらに、細胞内伝達において、検討したところ、塩化

リチウムは、ketamine により誘発される自発運動促進効果に対して影響を及ぼさなかったが、PF-2545920 はほぼ完全に抑制した。

Katamine の依存性をより正確に捉えるために MDMA、U50,488H あるいは quinpirole という幻覚誘発と密接に関連する薬物によって誘発される摂取感覚と ketamine により発現する感覚との類似性を検討したところ、ketamine は MDMA、U50,488H および quinpirole の弁別刺激効果に対していずれも部分的に般化した。

D. 考察

Piperidine 誘導体の評価:ほとんどの依存形成薬物は、脳内のモノアミン神経系を活性化することにより精神刺激薬様の摂取感覚効果を誘発すると同時に、齧歯類においては自発運動促進効果を引き起こす。このような背景からこれまで自発運動促進効果が引き起こされる薬物は、精神刺激薬様の摂取感覚効果を引き起こし、自発運動を検討することは、薬物依存性を評価する指標として有用であるとされてきた。特に、近年乱用が問題となってきた幻覚誘発物質は、自己投与方法あるいは条件付け場所嗜好性試験によって強い精神依存を引き起こしにくいことから自発運動あるいは摂取感覚効果による評価の必要性が高まっていた。昨年度、麻薬に指定されている TFMPP および 3-CPP を用いて MDMA 様の弁別刺激効果の発現の有無について検討したところ、3-CPP は MDMA の弁別刺激効果に対して般化を示したのに対し、TFMPP は般化を示さなかった。これらの結果をもとに従来の一般的な考え方が当てはまるか否か

を検討したところ、TFMPP によって自発運動促進効果が認められたものの、3-CPP では自発運動促進効果は認められなかった。3-TFMPP および 3-CPP は phenylpiperadine 骨格を有し、これまで世界各国においても乱用がカチノン系薬物と比べ問題となつてこなかったが、各国でカチノン系薬物の規制が強まり、今後、誘導体化がしやすいピペラジン誘導体の合成および乱用が懸念される。そこで、置換基を持たない phenylpiperadine そのものに依存形成能があるかについて検討したところ、phenylpiperadine は、自発運動促進効果に影響を及ぼさなかったものの、MDMA 様の弁別刺激効果を有していることが示された。以上の結果より、phenylpiperadine 骨格を有する薬物の評価において、自発運動促進効果と MDMA 様の弁別刺激効果に相関は認められないものの、いずれも乱用の危険性があることを示唆された。こうした自発運動促進効果と MDMA 様の弁別刺激効果の間に相関が認められない例はカチノン系ドラッグのいくつかには認められており、セロトニン系受容体を刺激する母核を持った薬物の蓋然性評価においては、少なくとも1つの評価系では十分ではなく、自発運動と MDMA 様の弁別刺激効果、あるいは行動観察などを含め複数の評価系を用いて検討する必要があると考えられた。

NMDA-拮抗薬の評価： NMDA-受容体を遮断して依存性を発現すると考えられている ketamine の行動変化を評価することにより乱用に関する蓋然性評価系の構築について

の検討を行った。Ketamine を処置することにより用量依存的な歩行失調を伴う自発運動促進効果が認められた。このうち 10mg/kg の ketamine によって発現する自発運動促進効果は、enkephalin 欠損マウスおよび δ -受容体拮抗薬である naltrindole によって抑制された。また、GSK-3 β を阻害する塩酸リチウムでは、ketamine の効果は抑制されなかったものの phosphodiesterase 10 阻害薬である PF-2545920 によってほぼ完全に抑制された。これらの抑制が認められた条件では、methamphetamine によって発現する自発運動促進効果は全く抑制されないことが一般的に知られているため、ketamine の精神刺激作用の発現機序は methamphetamine による機序とは明らかに異なることが示唆された。よって、今後は、本研究結果をもとに、全く新たな評価系として NMDA-遮断作用を有する薬物を評価する系を構築していく。

さらに、弁別刺激効果を指標に蓋然性評価系の構築を行うことを念頭に、幻覚誘発薬としての ketamine の感覚について検討した。幻覚を発現する機序を持つ MDMA、U50,488H (κ -受容体作動薬) あるいは quinpirole (D_2 -受容体作動薬) の摂取感覚の弁別を可能としたラットを用いて ketamine との類似性を般化試験により検討した。その結果、ketamine はいずれの薬物の弁別刺激効果に対して部分的般化を示した。以上のように、ketamine は、各種幻覚誘発物質とある程度共通する感覚を有しており、ketamine の感覚との類似性は、幻覚誘発薬の乱用を予測する系の構築に重要であると考えられた。今後

ketamine により弁別を獲得した動物を作製し、こうした動物によって NMDA-拮抗薬に特有の感覚から乱用の危険性についての蓋然性評価系を検討していく。

E. 結論

弁別刺激効果による蓋然性評価と比べ、自発運動促進効果による評価は非常に簡便でスクリーニング的にも非常に有用と考えられてきた。しかしながら、蓋然性評価において、乱用の危険性があるものの、運動の活性化作用を有さない薬物が多数存在するために自発運動に頼った評価では、多くの偽陰性が懸念される。弁別刺激効果においては、その選択性の高さから訓練薬物と機序が異なる場合には、類似性を示さないことが十分に想定される。乱用が予測される新規化合物の蓋然性評価において、こうした各評価系の特徴を考えた上でも、評価する構造に特異的な行動変化を評価出来る評価系をいくつか構築し、これらを使用して包括的に評価する必要があると考えられる。

F. 参考文献

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida S, Hamada Y, Narita M, Sato D, Tanaka K, Mori T, Tezuka H, Suda Y, Tamura H, Aoki K, Kuzumaki N, Narita M. Elucidation of the mechanisms

underlying tumor aggravation by the activation of stress-related neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. (2023) Mol Brain. 16:18.

2) Sato D, Hamada Y, Narita M, Mori T, Tezuka H, Suda Y, Tanaka T, Yoshida S, Tamura H, Yamanaka A, Senba E, Kuzumaki N, Narita M. Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D1-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens. (2022) Molecular Brain 15:17.

3) Mori T, Yamashita K, Takahashi K, Mano S, Sato D, Narita M. Characterization of the discriminative stimulus effect of quinpirole: Further evidence for functional interaction between central dopamine D₁/D₂-receptors. (2022) Pharmacol Biochem Behav. 213:173314.

4) Mori T, Iwase Y, Uzawa N, Takahashi Y, Mochizuki A, Fukase M, Shibasaki M, Suzuki T. Synergistic effects of MDMA and ethanol on behavior: possible effects of ethanol on dopamine D₂-receptor-related signaling. (2021) Addict Biol e13000.

5) Mori T, Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T. Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice. (2021) Behav Brain Res. 396: 112802.

6) Mori T, Takemura Y, Arima T, Iwase Y, Narita M, Miyano K, Hamada Y, Suda Y, Matsuzawa A, Sugita K, Matsumura S, Sasaki S, Yamauchi T, Higashiyama K, Uezono Y, Yamazaki M, Kuzumaki N, Narita M. Further investigation of the rapid-onset and short-duration action of the G protein-biased μ -ligand oliceridine. *Biochem Biophys Res Commun* (2021) 534: 988-994.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

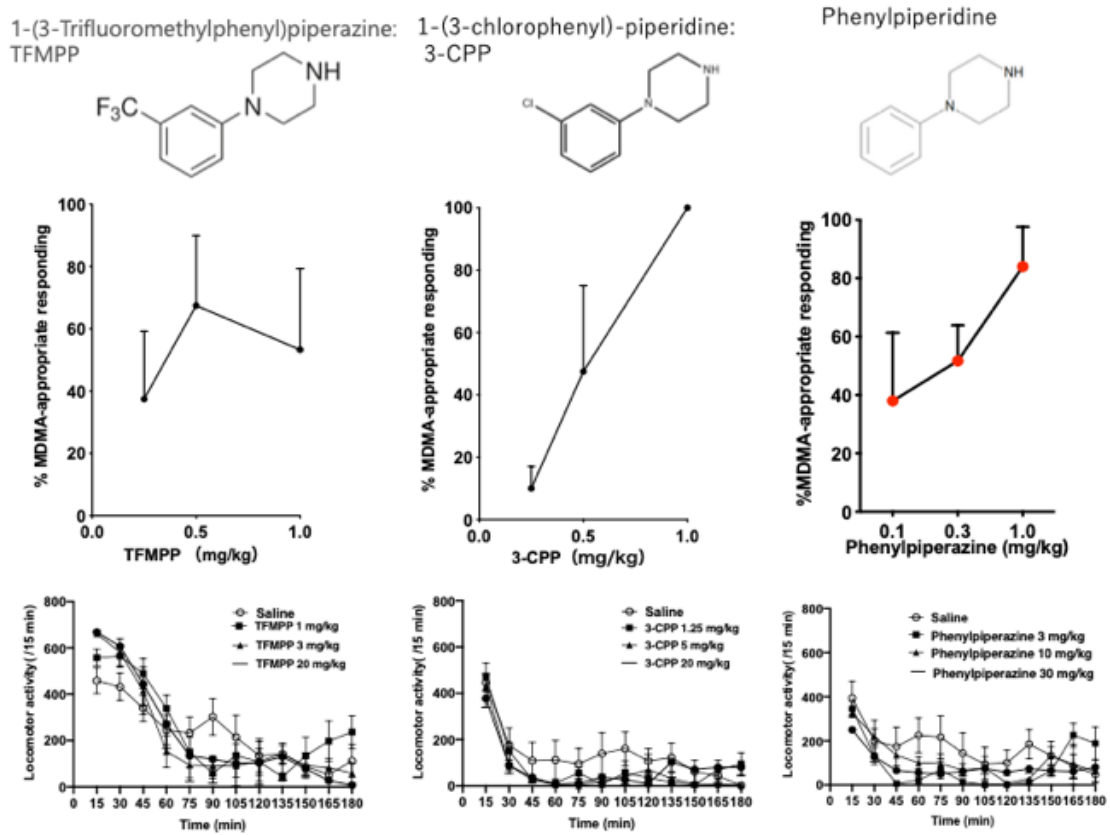


図1 1-(3-Trifluoromethylphenyl)piperazine(TFMP:左)、1-(3-chlorophenyl)-piperidine (3-CPP:中央) および phenylpiperazine(右)の構造 (上段パネル)、MDMA の弁別刺激効果に対する般化 (中段パネル) および自発運動に及ぼす効果 (下段パネル)

令和5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)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

分担研究報告書

幻覚剤 DOI によるマウス行動異常・精神変調・

モノアミン代謝回転について

分担研究者：北中純一 兵庫医科大学 薬学部

【研究要旨】

幻覚作用を有する 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI)によって引き起こされるマウス異常行動（前肢洗顔行動・後肢引っ掻き行動・伏臥位・首振り行動）のうち、首振り行動以外は DOI の用量依存的に発現頻度が増加した。前肢洗顔行動（投与後 0-20 分）と伏臥位（投与後 20-60 分）発現頻度との間には正の相関関係 ($R^2=0.6197$) が認められた。DOI 投与によって、新奇物体への関心やガラス玉埋め行動の減少傾向が認められたが、水平方向の総運動量は変化しなかった。DOI 誘導異常行動と大脳皮質・線条体および側坐核・海馬各部位におけるモノアミン代謝回転との間に相関は認められなかった。

A. 研究目的

幻覚作用を有する指定薬物の指定に係る基本的評価指標を確立するため、5-HT_{2A} 受容体アゴニストである 1-(4-iodo-2,5-di-methoxyphenyl)propan-2-amine 塩酸塩 (DOI) をマウスに投与した場合の異常行動について、その発現様式、時間依存性、各異常行動間の頻度の相関性を検討する。同時に、脳特に大脳皮質・線条体および側坐核、海馬各部位におけるモノアミンおよびその代謝物の量的変動を調べ、異常行動との相関関係を調べる。新奇環境に暴露されたときのマウスの

行動に DOI がどのような影響を与えるかについて、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験を合わせて実施した。

B. 研究方法

ICR 系雄性マウス（実験時 11-12 週齢）に対して、生理食塩水に希釈した DOI の 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg を皮下投与 (s.c.) し、直ちに観察用アクリルボックス (30×30×35 cm 高；床面に約 25 g 分の木くず) に入れて行動観察および Supermex センサによる水平方向総運動量の測定を行った。行動観察は、投与薬物

が知らされていない熟練した複数の観察者によって行われた。DOIによる特異的な行動の観察項目は、前肢洗顔行動・伏臥位・後肢引っ掻き行動・首振り行動とし、30秒ごとに前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動の回数を記録し、伏臥位や首振りが確認されたか否かを記録した。観察後直ちに脳各部位を摘出して液体窒素中に保存した。モノアミンおよびその代謝物含量は、電気化学検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (ECD-HPLC) で検出した。DOI投与下の新奇環境への馴化を検討するため、新奇物体探索行動およびガラス玉埋め試験を行った。

(倫理面への配慮) 兵庫医科大学動物実験委員会の承認を得た(承認課題第20-059A号(改訂)および第22-303A号(改訂))。「動物実験に関する日本薬理学会指針」ならびに「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、2006年6月1日)および兵庫医科大学動物実験規定を遵守した。動物逃避防止を徹底し実験動物に苦痛を与えないよう最大限配慮を行い、人道的エンドポイントを十分配慮のうえ安全対策を講じて、承認を受けた実験室でのみ実施した。

C. 研究結果

水平方向の総運動量測定について、タイムコースは新奇環境への馴化パターンを示しており興奮性は認められなかったが、DOI用量が高いほど総運動量は大きい傾向を示した。特に1.0 mg/kg, s.c.での運動量は対照群と比較して有意に増加した。行動指標としては、前肢洗顔行動および後肢引っ掻き行動は

DOI投与15分で主に観察され、20分過ぎまで継続しその後頻度は減少した。引き続き、伏臥位が発現し、投与1時間まで継続した。特に前肢洗顔行動と伏臥位の発現頻度間で、強い相関関係が認められた (Fig. 1)。首振りは投与後1時間内に観察が間断的に継続した。首振り行動以外の異常行動はDOIの用量反応性を示した。

脳内モノアミン量(ドーパミン・セロトニン・ノルアドレナリン、およびそれらの代謝物)の変動と、そこから導き出されるモノアミン代謝回転の程度に関して、ECD-HPLC測定の結果、行動変化に相関するようなモノアミン代謝回転の変動は認められなかった。

新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験において、1.0 mg/kg DOI投与はそれら新奇環境への関心度の低下とみられる行動(新奇物体への接触頻度低下およびガラス玉埋め総数の減少)が確認された。

D. 考察

前肢洗顔行動と伏臥位は、いずれもDOIの用量依存的に発現し、かつそれらの発現頻度間には強い相関関係 ($R^2 = 0.6197$) が認められた。一方、たとえば後肢引っ掻き行動(投与後0-20分)と伏臥位(投与後20-60分)との間 ($R^2 = 0.1213$)、あるいは、前肢洗顔行動(60分間)と後肢引っ掻き行動(60分間)の頻度間では相関関係は認められなかった ($R^2 = 0.4587$) (Fig. 1)。この結果は、ICR系マウスを用いた場合、DOIのような幻覚作用を有している薬物の異常行動指標として、投与後前肢洗顔行動、そして引き続いて伏臥位が認

められた場合、DOIの幻覚作用を評価する行動基準となり得ることを示している。従来、首振り行動は幻覚剤のげっ歯類における、よく知られた反応である(1,2)。しかし本研究で用いた実験系では、もっとも用量反応性に乏しい行動パターンであった。首振り行動は特異な行動の一つであり、明らかにDOI投与で誘導されているので、動物種(あるいはその系統)に影響を受けている結果の可能性は否定できない。評価系としては、幻覚剤の作用の強さを検定あるいは予測する上で、用量反応性を考慮しなければならない。その用量反応性については、マウスのおかれた研究環境の違い(たとえば観察ボックス内の環境=床敷きの有無など)に起因する可能性がある。

DOI投与マウスは、5-HT₂受容体を介した短期空間記憶力の低下がマウスにおいて認められているため(Fig. 2)、新奇環境への順化は影響を受けることが予想された。事実、新奇物体探索試験およびガラス玉埋め試験における測定パラメータの減少は、新奇環境への関心の低下を示しており、それが前肢洗顔行動や伏臥位といった異常行動の発現とどのような関係にあるのかについて、さらに検討を進めたい。

E. 結論

幻覚剤による異常行動は、ICR系マウスを実験系とした場合、特に前肢洗顔行動とそれに続く伏臥位の発現頻度とが、用量依存性、発現強度の相関性の観点から有効な観察基準と考えられた。それらの異常行動と、DOIによる環境変化への関心低下との

間の関係について、今後、学習・短期空間記憶(Morris水迷路試験)と行動変化との関連を調べる(行動評価方法の検証)。またDOI用量反応性に行動相関が認められる前肢洗顔行動および伏臥位を制御するメカニズム(5-HT₂受容体系, opioid受容体系, 視床下部ヒスタミン系等)を明らかにして、情報伝達物質の量的変動から幻覚剤の評価が可能か検証したい。

F. 参考文献

- 1) Halberstadt A.L. & Geyer M.A. Effect of hallucinogens on unconditioned behavior. *Curr Top Behav. Neurosci.* **36**, 159-199 (2018).
- 2) Canal C.E. & Morgan D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re-evaluation of mechanisms, and its utility as a model. *Drug Test Anal.* **4(7-8)**, 556-76 (2012)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Takashi Y., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Nishitani Y. & Sato T. Therapeutic potential for KCC2-targeted neurological diseases. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **59**, 431-438 (2023)
- 2) Kitanaka J., Kitanaka N., Tomita K., Hall S.F.,

Igarashi K., Uhl G.R. & Sato T. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors block morphine-induced locomotor activation, Straub tail, and depression of rearing in mice via a possible central action. *Neurochem. Res.*, **48(7)**, 2230-2240 (2023)

- 3) Tomita K., Oohara Y., Igarashi K., Kitanaka J., Kitanaka N., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Sugimura, M. & Sato, T. Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression via neuroinflammation induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice. *Heliyon* **9(12)** e22784 (2023).
- 4) Oka M., Yoshino R., Kitanaka N., Hall F.S., Uhl G.R. & Kitanaka J. Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Dependence and Abuse Liability of Alcohol. *Alcohol Alcohol.* **59(2)** agad086 (2024).
- 5) Kitanaka N., Arai K., Takehara K., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & Kitanaka J. Opioid receptor antagonists reduce motivated wheel running behavior in mice. *Behav. Pharmacol.* **35(2/3)**114-121 (2024)

2. 学会発表

- 1) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐健人、新井香奈代、竹原薫生子、仲井聖典、濱名貴大、松田健太郎、湯瀬祥、佐藤友昭. μ オピオイド受容体選択的拮抗薬単独与薬によるマウス動機付け行動への影響 第 16 回日本緩和医療薬学会 2023. 5. 26-28 (神戸)
- 2) 北中純一、北中順恵、富田和男、五十嵐

健人、新井香奈代、竹原薫生子、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭. オピオイド受容体拮抗薬のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響 第 64 回日本神経病理学会総会学術研究会/第 66 回日本神経化学学会 合同大会 2023. 7. 6-8 (神戸)

- 3) 北中純一、北中順恵、湯瀬祥、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好. 幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine は短期空間記憶や気分の障害を引き起こす 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
- 4) 湯瀬祥、北中順恵、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一. 幻覚剤 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine によって引き起こされる行動異常の特徴について. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
- 5) 北中順恵、新井香奈代、竹原薫生子、富田和男、五十嵐健人、濱名貴大、松田健太郎、仲井聖典、湯瀬祥、佐藤友昭、北中純一. オピオイド受容体拮抗薬ナロキソン単回投与のマウス動機付け行動および脳モノアミン代謝回転への影響. 第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)
- 6) 仲井聖典、北中順恵、濱名貴大、松田健

太郎、湯瀬祥、藤井舞、津嶋祐一郎、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、西山信好、北中純一。GSK-3 阻害薬 CHIR-99021 前処置はモルヒネによる Straub の挙尾反応と退薬症状を抑制する。第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)

7) 松田健太郎、北中順恵、濱名貴大、仲井聖典、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一。GSK-3 阻害薬 LY2090314 前処置による覚せい剤誘導過運動・常同行動への効果。第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)

8) 濱名貴大、北中順恵、仲井聖典、松田健太郎、湯瀬祥、富田和男、五十嵐健人、佐藤友昭、北中純一。ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害薬 Wortmannin は、覚せい剤誘導繰り返し嗅ぎ行動および嘔み行動を抑制し、その結果常同行動の発現全体を緩和する。第 97 回日本薬理学会年会・第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 2023. 12. 14-16 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

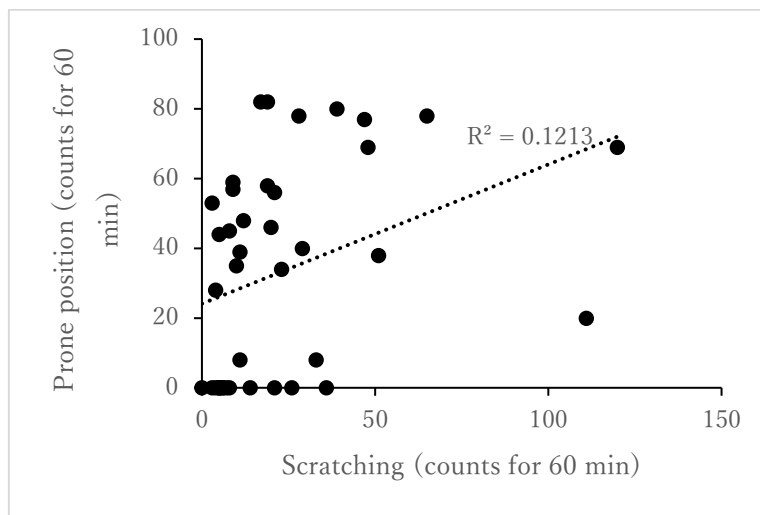
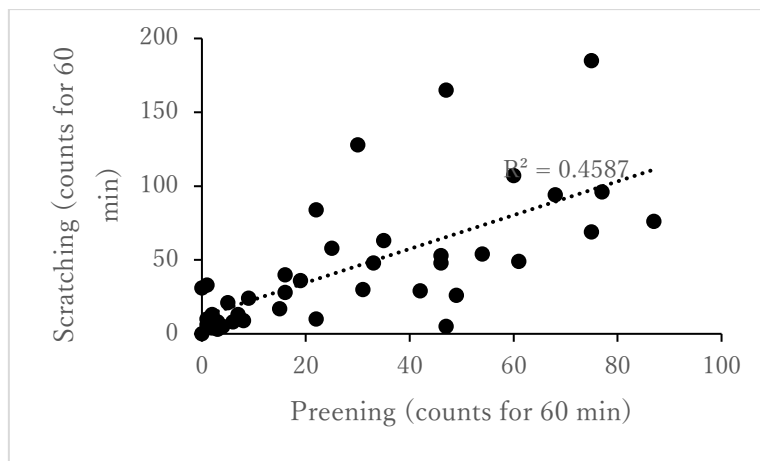
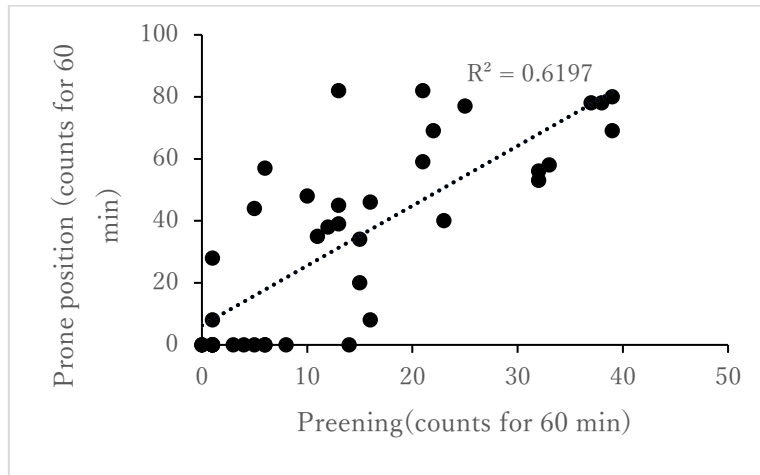


Fig. 1. DOI 誘発異常行動間の相関関係

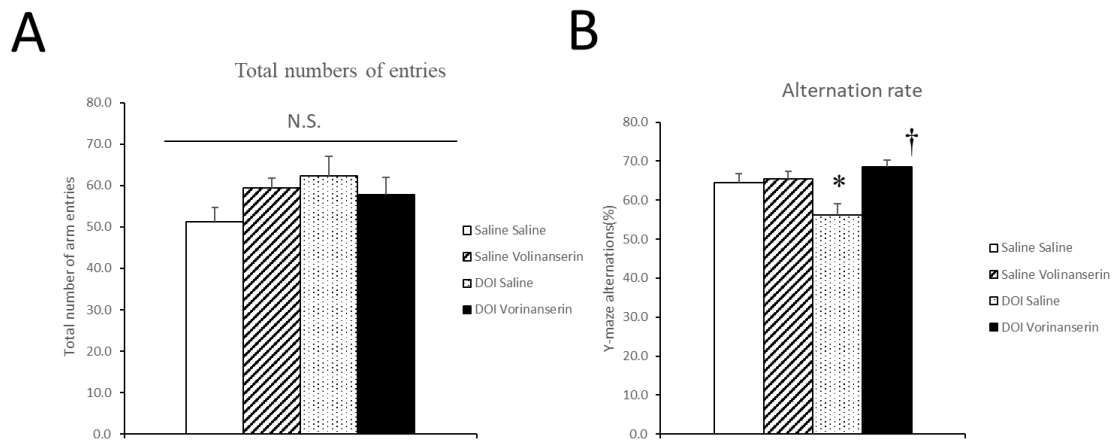


Fig. 2. DOI 誘発短期空間記憶障害

令和5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)
指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

分担研究報告書

危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

分担研究者：増川太輝 横浜市立大学 医学部

【研究要旨】

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、従来、アミノ酸脱炭酸酵素によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。我々は、ドーパの遊離が、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって増加するのに対して、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制させること、ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化が、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルによって抑制されることを見出してきた。これらのことは、ドーパが精神症状の一部に関与することを示す。本研究においては、ドーパの遊離、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

セロトニン 2A 受容体とドーパ/GPR143 シグナルとの関連性を明らかにするため、GPR143 欠損マウスを用いて、セロトニン 2A 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) の薬理作用を野生型と比較・検討した。結果、GPR143 欠損マウスにおいて野生型と比較し、DOI による運動量増加作用および側坐核における c-Fos 発現増加作用が増強した。次に、マイクロダイアリシスを用いて、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定を試みたところ、側坐核におけるこれらの神経伝達物質検出が可能となった。さらに、セロトニン 2A 受容体発現 CHO 細胞に DOI を処置すると、ERK リン酸化レベルが上昇し、DOI の効果は GPR143 の共発現により増強した。これらの結果は、GPR143 がセロトニン 2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

A. 研究目的

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、アミノ酸脱炭酸酵

素 (AADC) によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。一方において、我々は、ドーパが神経伝達物質として機能する知見を集積してきた。

ドーパは、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって遊離され、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制する。ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステル (DOPA CHE) によって抑制される^{2,3)}。長い間、ドーパに対する受容体は不明であったが、我々は、眼白子症の原因遺伝子産物である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の GPR143 がドーパ受容体の一つであることを見出した⁴⁾。GPR143 欠損 (GPR143 KO) マウスを用いて表現型解析を行った結果、ニコチンによる運動量変化および報酬効果が、GPR143 KO マウスにおいて野生型 (WT) と比較し、減弱した⁵⁾。また、抗精神病薬の薬理作用についても GPR143 KO マウスにおいて抑制される⁶⁾。これらのことは、精神賦活薬によって遊離されたドーパが、GPR143 を介して精神症状を発現することを示す。

本研究においては、ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離および、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、6-12 週齢の GPR143 KO マウスおよび WT マウス (体重 20-28 g) を用いた。

動物実験は、横浜市立大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 F-A-23-010)。

2. 運動量測定

自発運動量を評価するため、マウスは運動量測定試験の少なくとも 1 時間前に防音室の環境に順化させた。その後、使用するマウスをそれぞれ 70 ルクスの照明条件に設定されたチャンバー (50×50×40cm³) に入れた。移動距離 (cm) は 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) および saline 投与前 60 分、後 120 分間記録した。Open field での活動は、画像ソフト (TimeOFER4 : O'Hara & Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて定量化した。

3. 免疫染色

DOI (1 mg/kg) または saline を腹腔内投与し、1 時間後に、イソフルラン (3%) の吸入麻酔下で、4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。側坐核を含む 50 μm の切片をビブラトームを用いて作成した。抗 c-Fos 抗体 (1:1000, Cell Signaling) を用いて、一次抗体反応後、Alexa fluoro 488 goat anti-rabbit IgG plus 抗体により可視化した。また DAPI を用いて核を可視化した。蛍光シグナルは、AX 顕微鏡 (Leica) により観察した。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を計測し、定量化した。

4. 神経伝達物質遊離量測定

ドーパ、ドパミンおよびセロトニンを同時に測定するために、マイクロダイアリシスを行った。マウスをイソフルラン (3%) の吸入麻酔下で、脳定位装置を用いて頭部を固定し、ガイド (AG-6) およびダミー (AD-6) カニューレ (Eicom, Kyoto, Japan) を側坐核 (Bregma より前方 1.5 mm、左右 0.9 mm、深さ 4.9 mm) に挿入した。手術から 2 日後、マイクロダイア

リシスプローブ (FX-I-6-02, Eicom, Kyoto) を留置していたガイドカニューレに挿入し、2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で、リングル液を注入した。2 時間の馴化後、20 分おきにサンプルを回収した。サンプルは、等量の 0.1% ギ酸を含む超純水を展開溶媒として混合し、測定まで -80°C で保存した。回収したサンプルにおけるドーパ、ドパミン、セロトニンの濃度は、MicroLC-MS/MS (Xevo TQS, MA, U.S.A) により測定した。分析カラムには UPLC column ACQUITY HSS T3 C18 (WT186003539, Waters, MA, U.S.A)、とガードカラムには guard column (WT186003976, Waters, MA, U.S.A) を、移動相には 3% アセトニトリルと 0.1% ギ酸を含む超純水を用いた。

5. ウェスタンブロット解析

セロトニン 2A (5-HT2A) 受容体-mCherry を安定に発現している Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に、FuGENE6 を用いて Gpr143-flag および pSN-flag プラスミドでそれぞれ導入した。2 日間の培養後、DOI (1 および 10 μM) を処理し、免疫沈降バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 0.1% Nonidet P-40, 0.1% プロテアーゼ阻害剤) で溶解した。サンプルを SDS-PAGE (9%) で分離、PVDF メンブレンに転写し、抗 extracellular signal-regulated kinase (ERK)、pERK 抗体 (#9102, #9101, Cell Signaling) を用いて各タンパク質量を定量した。

6. 統計解析

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差により示

し、Prism 10 により解析した。データは三元または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、ポストホックテストとして、Tukey's または Bonferroni's multiple comparison test により比較した。

C. 研究結果

1. GPR143 は DOI による薬理作用を負に制御する

GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を修飾するか否かを明らかにするため、まず、DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与による自発運動促進作用を WT および GPR143 KO マウスを用いて比較・検討した。DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させた。その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,26)=39.76$, $P<0.001$; genotype, $F(1,26)=5.430$, $P=0.028$; interaction, $F(1,26)=4.757$, $P=0.038$, 図 1)。次に、DOI (1 mg/kg) 投与による側坐核における c-Fos 発現変化について検討した。運動量と同様、DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させ、その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,16)=94.77$, $P<0.001$; genotype, $F(1,16)=2.951$, $P=0.105$; interaction, $F(1,16)=5.543$, $P=0.032$, 図 2)。

2. ドーパ、ドパミン、セロトニンは側坐核より遊離する

我々は昨年度の報告においてドーパとドパミンの同時測定系を確立している⁶⁾。検出時間を延長させたところ、ドーパ、ドパミンに加え

てセロトニンのスタンダードシグナルが検出され、このシグナルは側坐核におけるマイクロダイアリシスサンプルでも確認できた (図 3)。よって脳内における 3 種神経伝達物質の同時測定系が確立できた。来年度には幻覚薬によるドーパ遊離の変化を解析する予定である。

3. GPR143 は DOI による ERK のリン酸化を抑制する

次に、5-HT2A 受容体と GPR143 の直接的な機能連関を明らかにするため、5-HT2A 受容体を安定的に発現する CHO 細胞に GPR143 を発現させ、DOI 刺激による ERK のリン酸化反応を検討した。DOI は ERK のリン酸化タンパク質量を増加させたが、その効果は GPR143 を発現させることにより増強した (dose, $F(2,28)=35.50$, $P<0.001$; plasmid, $F(1,14)=4.726$, $P=0.047$; interaction, $F(2,28)=4.619$, $P=0.019$, 図 4)。これらの結果は、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に制御することを示唆する。

D. 考察

本研究では、GPR143 KO マウスにおいて DOI による運動量促進作用および c-Fos 発現増加作用が増強された。また、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定系を確立した。これらの結果は、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

ドーパは、GPR143 のリガンドなので、内在性に遊離するドーパが、5-HT2A 受容体の機能を制御する可能性が高い。ドーパの遊離は、メタンフェタミンやニコチンなどのドパミン神

経賦活薬によって、増加する。メタンフェタミンおよびニコチンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬である DOPA CHE により抑制される^{2,3)}。今後は、ドーパが GPR143 を媒介し、精神症状を示すのか？ドーパは、指定薬物による幻覚作用を媒介するのか？ドーパはどのような指定薬物によって遊離されるのか？を明らかにする必要である。

GPR143 は、他の GPCR と複合体を形成することによって、その機能を修飾することが報告されている。実際に GPR143 は、アドレナリン $\alpha 1$ 受容体との機能連関を介して生理的な血圧調節を担う⁴⁾。線条体において、ドパミン D2 受容体と相互作用し、ドパミン D2 受容体を介する薬理作用を調節する^{6,7)}。本年度の CHO 細胞を用いた実験結果より、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を負に修飾することが明らかとなった。このことは、GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を複合体形成を介して抑制している可能性を示唆する。GPR143 とセロトニン 2A 受容体との機能連関メカニズムについて、更なる検討が必要である。

E. 結論

本研究では、① GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を抑制することを明らかにし、②ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離測定系を確立した。ドーパ測定系が指定薬物の評価に有効であるかを検討する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Misu Y, Goshima Y. Is L-dopa an endogenous

- neurotransmitter? *Trends Pharmacol Sci* 1993;14(4):119-23.
- 2) Goshima Y, Miyamae T, Nakamura S *et al.* Ventral tegmental injection of nicotine induces locomotor activity and L-DOPA release from nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 1996; 309(3):229-33.
 - 3) Matsushita N, Misu Y, Goshima Y. *In vivo* antagonism of the behavioral responses to L-3,4-dihydroxyphenylalanine by L-3,4-dihydroxyphenylalanine cyclohexyl ester in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2009;605(1-3):109-13.
 - 4) Masukawa D, Koga M, Sezaki A *et al.* L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular alpha1-adrenergic receptor. *JCI Insight* 2017; 2(18). pii: 90903. doi: 10.1172/jci.insight.90903.
 - 5) Masukawa D, Nishizawa D, Goshima Y, *et al.* Genetic associations of single nucleotide polymorphisms in the L-DOPA receptor (GPR143) gene with severity of nicotine dependence in Japanese individuals, and attenuation of nicotine reinforcement in Gpr143 gene-deficient mice. *J Pharmacol Sci*. 2020;144(2): 89-93.
 - 6) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, *et al.* Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*. in press.
 - 7) Masukawa D, Kitamura S, Goshima Y, *et al.* Coupling between GPR143 and dopamine D2 receptor is required for selective potentiation of dopamine D2 receptor function by L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the dorsal striatum, *J Neurochem*, 2023; doi: 10.1111/jnc.15789.
 - 8) Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther*. 2004; 101:131–181. [PubMed: 14761703]

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masukawa D (corresponding author), Takahagi R, Nakao Y, Goshima Y. L-DOPA Receptor GPR143 Functionally Couples with Adrenergic α 1B Receptor at the Second Transmembrane Interface. *Biol Pharm Bull*. 46: 869-873, 2023
- 2) Uchimura H, Kanai K, Arai M, Inoue M, Hishimoto A, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate. *J Pharmacol Sci*. 152: 178-181, 2023
- 3) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, Otaki M, Kanai K, Yamasaki M, Watanabe M, Kambe Y, Murata K, Takada Y, Arisawa T, Kobayashi K, Tajika R, Miyazaki T, Yamaguchi M, Lazarus M, Hayashi Y, Itohara S, de Kerchove d'Exaerde A, Nawa H, Kim R, Bito H, Momiyama T, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*. in press.

2. 学会発表

1) 荒井柗美、増川太輝、北村慧、大瀧百々代、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介してハロペリドールによる錐体外路様症状を修飾する第 95 回日本薬理学会年会 (2022 年 11 月 30 日-12 月 3 日)

2) 荒井柗美、増川太輝、鈴木江津子、北村慧、大瀧百々代、靱山俊彦、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介して haloperidol 誘発性錐体外路様症状を修飾する.第 147 回日本薬理学会関東部会 (2023 年 3 月 21 日)

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

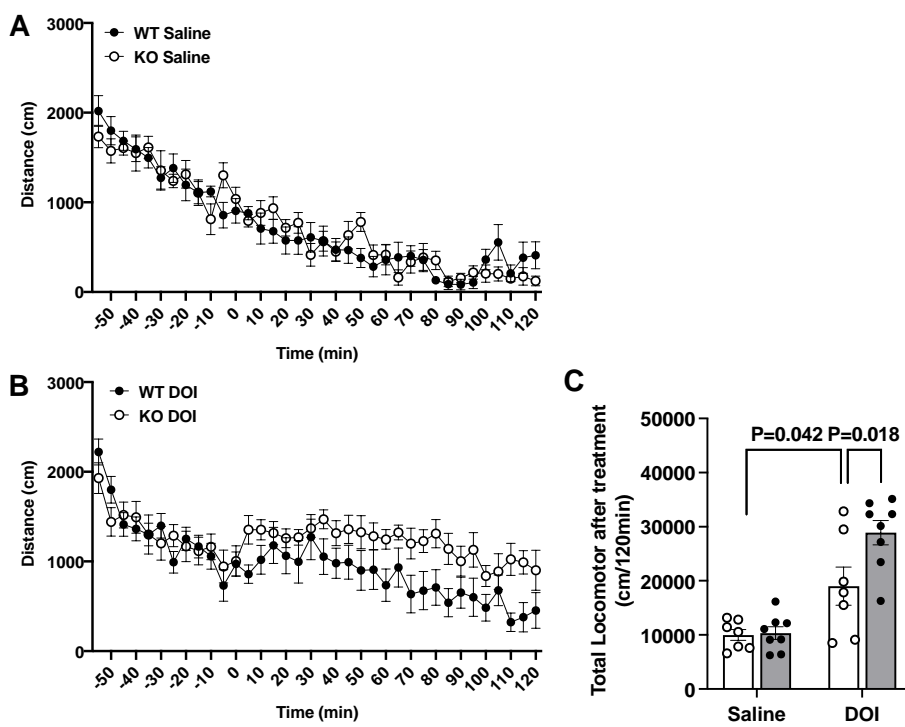


Fig. 1. DOI 投与による運動量の変化

(A) 生理食塩液 (Saline) または (B) DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与前後の WT マウスおよび GPR143 KO マウスにおける運動量変化。(C) は薬物投与後の総運動量を示す。

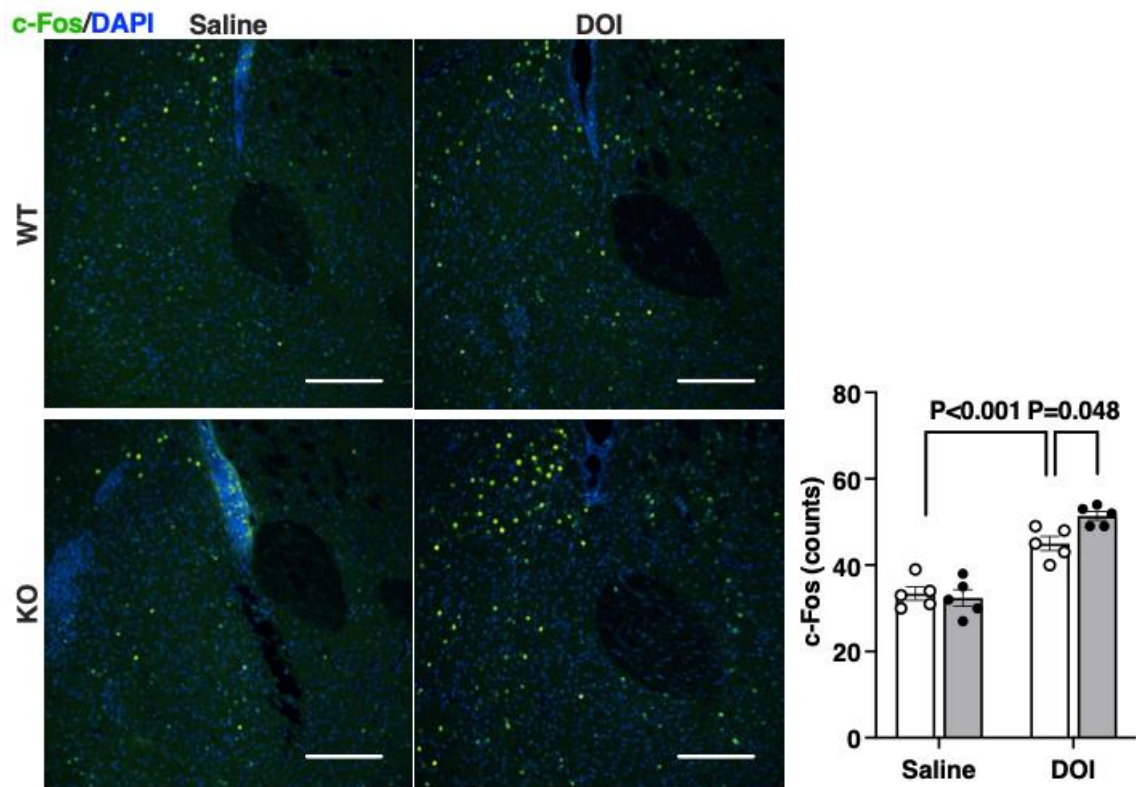


Fig. 2. DOI 投与による側坐核における c-Fos 発現変化

生理食塩液 (Saline) または DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与後の WT マウスおよび GPR143 KO マウス側坐核における c-Fos 発現変化 (左図)。緑で c-Fos、青で DAPI を示す。スケールバーは 200 μm 。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を定量化したもの (右図)。

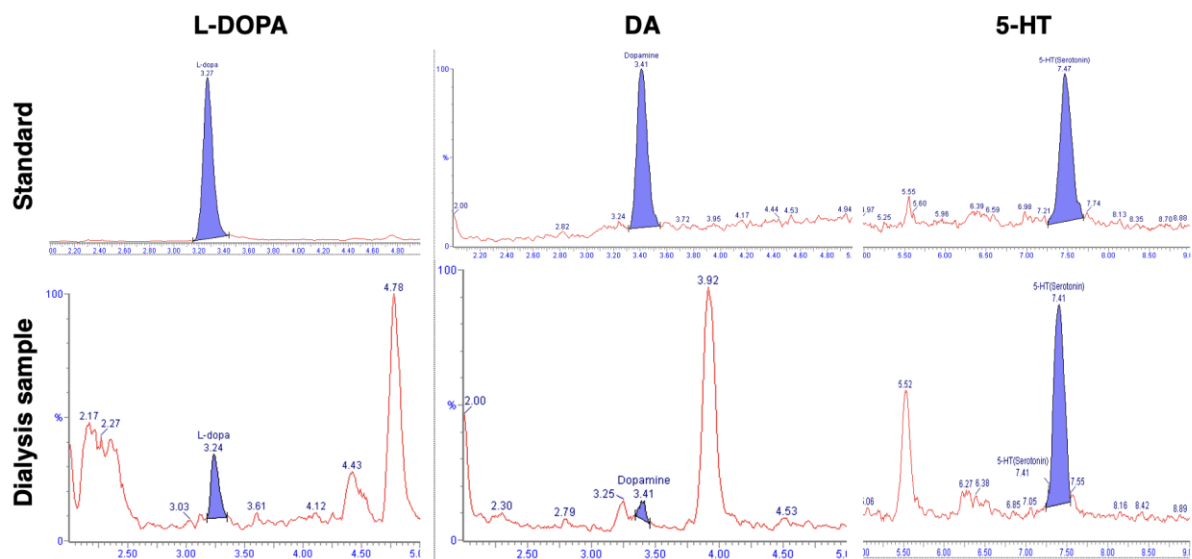


Fig. 3. 側坐核における L-DOPA、ドパミン (DA)、セロトニン (5-HT) の遊離
 LC-MS/MS を用いて L-DOPA、DA、5-HT のスタンダード (上図) および側坐核における遊離を検出したもの (下図)。スタンダードとダイアリスサンプルでほぼ同じリテンションタイムを示すピークが得られた。

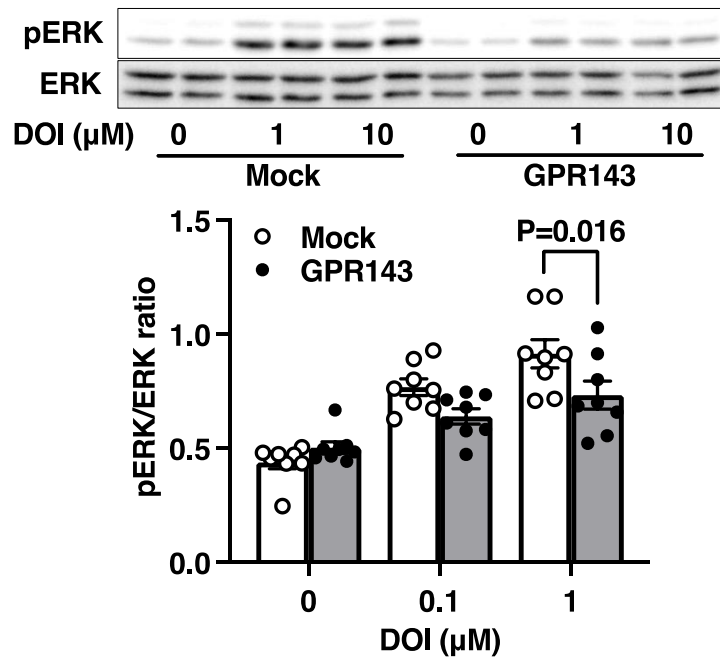


Fig. 4. GPR143 は DOI による ERK のリン酸化応答を抑制する

GPR143 もしくは Mock ベクターを発現させた 5-HT_{2A} 受容体発現 CHO 細胞に、DOI (1, 10 μM) を処置した際のリン酸化 ERK (pERK) タンパク質の発現変動。定量データは pERK/ERK のシグナル比を計算することにより算出した。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森 友久			生体毒性情報学 第2版	京都廣川書店	京都	2023	1-238

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H, Kagaya H.	A questionnaire-based study on the “Dame, Zettai. (Never. Ever.)” drug abuse prevention campaign and the medical use of narcotic agents	Jpn J Pharm Palliat Care Sci	15	121-128	2022
鈴木 勉	【別冊秋号オピオイド】(PART2)基礎編 オピオイド身体依存のメカニズム	LiSA 別冊	29別冊	165-168	2022
Mori T, Iwase Y, Uzawa N, Takahashi Y, Mochizuki A, Fukase M, Shibasaki M, Suzuki T.	Synergistic effects of MDMA and ethanol on behavior: possible effects of ethanol on dopamine D ₂ -receptor-related signaling	Addict Biol	26	e13000	2021
Mori T, Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T.	Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice	Behav Brain Res	396	112802	2021

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森 友久			生体毒性情報学 第2版	京都廣川書店	京都	2023	1-238

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki T, Hasegawa S, Koretaka Y, Mishima H, Tanaka H, Kagaya H.	A questionnaire-based study on the “Dame, Zettai. (Never. Ever.)” drug abuse prevention campaign and the medical use of narcotic agents	Jpn J Pharm Palliat Care Sci	15	121-128	2022
鈴木 勉	【別冊秋号オピオイド】(PART2)基礎編 オピオイド身体依存のメカニズム	LiSA 別冊	29別冊	165-168	2022
Mori T, Iwase Y, Uzawa N, Takahashi Y, Mochizuki A, Fukase M, Shibasaki M, Suzuki T.	Synergistic effects of MDMA and ethanol on behavior: possible effects of ethanol on dopamine D ₂ -receptor-related signaling	Addict Biol	26	e13000	2021
Mori T, Uzawa N, Masukawa D, Hirayama S, Iwase Y, Hokazono M, Udagawa Y, Suzuki T.	Enhancement of the rewarding effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in orexin knockout mice	Behav Brain Res	396	112802	2021

Sato D, Hamada Y, Narita M, <u>Mori T</u> , Tezuka H, Suda Y, Tanaka T, Yoshida S, Tamura H, Yamanaka A, Senba E, Kuzumaki N, Narita M.	Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D1-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens	Molecular Brain	15	17	2022
<u>Mori T</u> , Yamashita K, Takahashi K, Mano S, Sato D, Narita M	Characterization of the discriminative stimulus effect of quinpirole: Further evidence for functional interaction between central dopamine D ₁ /D ₂ -receptors	Pharmacol Biochem Behav	213	173314	2022
<u>Mori T</u> , Takemura Y, Arima T, Iwase Y, Narita M, Miyano K, Hamada Y, Suda Y, Matsuzawa A, Sugita K, Matsumura S, Sasaki S, Yamauchi T, Higashiyama K, Uezono Y, Yamazaki M, Kuzumaki N, Narita M.	Further investigation of the rapid-onset and short-duration action of the G-protein-biased μ -ligand oliceridine	Biochem Biophys Res Commun	534	988-994	2021
Yoshida S, Hamada Y, Narita M, Sato D, Tanaka K, <u>Mori T</u> , Tezuka H, Suda Y, Tamura H, Aoki K, Kuzumaki N, Narita M.	Elucidation of the mechanisms underlying tumor aggravation by the activation of stress-related neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.	Molecular Brain	16	18	2023
<u>船田正彦</u>	危険ドラッグの依存性	精神科	41	239-247	2022
<u>船田正彦</u>	海外の大麻規制変遷から考える国内の大麻規制再構築の意義	医薬品医療機器 レギュラトリー サイエンス	54	36-42.	2023

Moriya S, Yoneta Y, Kuwata K, Imamura Y, Demizu Y, <u>Kurihara M</u> , Kittaka A, Sugiyama T.	PreQ1 Facilitates DNA Strand Invasion by PNA	Peptide Science 2021	2022	111-112	2022
Ichimaru Y, Kato K, Kurihara M, Jin W, Koike T, Kurosaki H.	Bis(nitrato-κO)(1,4,8,11-tetra-aza-cyclo-tetra-decane-κ4 N)zinc(II) methanol monosolvate.	IUCrdata	7(Pt 8)	x220854.	2022
Yuyama M, Misawa T, Demizu Y, Kanaya T, <u>Kurihara M</u> .	Design and synthesis of novel estrogen receptor antagonists with acetal containing biphenylmethane skeleton	Results in Chemistry	3	100124	2021
Moriya S, Shibasaki H, Kohara M, Kuwata K, Imamura, Y, Demizu Y, <u>Kurihara M</u> , Kittaka A, Sugiyama T.	Synthesis and characterization of PNA oligomers containing preQ1 as a positively charged guanine analogue	Bioorg Med Chem Lett	39	127850	2021
Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., <u>Kitanaka J.</u> , Kitanaka N., Takashi Y., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Nishitani Y. & Sato T.	Therapeutic potential for KCC2-targeted neurological diseases.	Jpn. Dent. Sci. Rev.	59	431-438	2023
<u>Kitanaka J.</u> , Kitanaka N., Tomita K., Hall S.F., Igarashi K., Uhl G.R. & Sato T.	Glycogen synthase kinase-3 inhibitors block morphine-induced locomotor activation, Straub tail, and depression of rearing in mice via a possible central action.	Neurochem.	48(7)	2230-2240	2023

Tomita K., Oohara Y., Igarashi K., <u>Kitanaka J.</u> , Kitanaka N., Tanaka K., Roudkenar, M.H., Roushandeh, A.M., Sugimura, M. & Sato, T.	Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression via neuroinflammation induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice.	Heliyon	9(12)	e22784	2023
Oka M., Yoshino R., Kitanaka N., Hall F.S., Uhl G.R. & <u>Kitanaka J.</u>	Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta in Dependence and Abuse Liability of Alcohol.	Alcohol Alcohol.	59(2)	agad086	2024
Kitanaka N., Arai K., Takehara K., Hall F.S., Tomita K., Igarashi K., Sato T., Uhl G.R. & <u>Kitanaka J.</u>	Opioid receptor antagonists reduce motivated wheel running behavior in mice.	Behav. Pharmacol.	35(2/3)	114-121	2024
<u>Masukawa D</u> (corresponding author), Takahagi R, Nakao Y, Goshima Y.	L-DOPA Receptor GPR143 Functionally Couples with Adrenergic α 1B Receptor at the Second Transmembrane Interface.	Biol Pharm Bull.	46	869-873	2023
Uchimura H, Kanai K, Arai M, Inoue M, Hishimoto A, <u>Masukawa D</u> (corresponding author), Goshima Y.	Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate.	J Pharmacol Sci.	152	178-181	2023

<p>Arai M, Suzuki E, Kitamura S, Otaki M, Kanai K, Yamasaki M, Watanabe M, Kambe Y, Murata K, Takada Y, Arisawa T, Kobayashi K, Tajika R, Miyazaki T, Yamaguchi M, Lazarus M, Hayashi Y, Itohara S, de Kerchove d'Exaerde A, Nawa H, Kim R, Bito H, Momiyama T, <u>Masukawa D</u> (corresponding author), Goshima Y.</p>	<p>Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons.</p>	<p>J Neurosci.</p>			<p>出版中</p>

令和5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)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究

課題番号：22KC1005

総括研究報告書

分担研究報告書

研究代表者：鈴木 勉

(湘南医療大学 薬学部)

令和6(2024)年3月31日発行

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和6(2024)年3月31日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 湘南医療大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 大屋敷英志枝

次の職員の(元号) 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 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
- 研究課題名 指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 湘南医療大学薬学部・学部長/教授
(氏名・フリガナ) 鈴木 勉・スズキ ツトム

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況 受講 未受講

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。